

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**Análisis del sistema endocannabinoide en la enfermedad de
Parkinson: hacia un tratamiento polivalente**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Palomo Garo

Directores

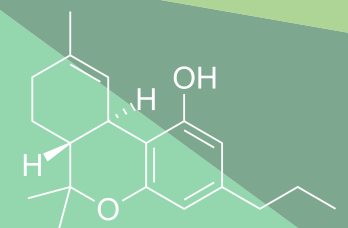
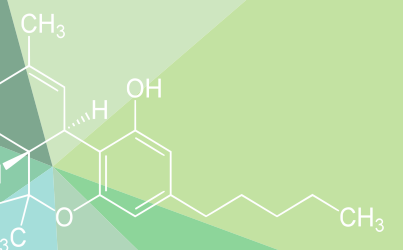
**María Concepción García García
Javier Fernández-Ruiz**

Madrid, 2017

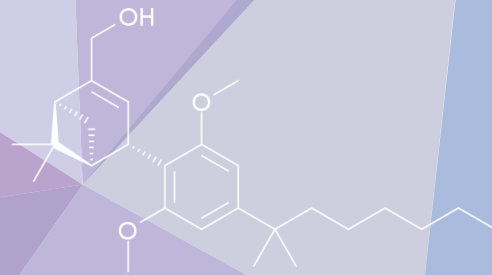
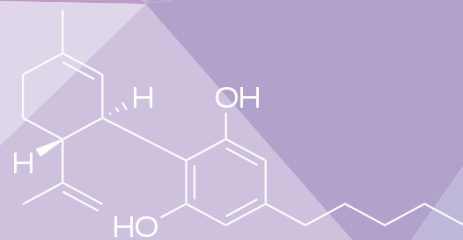
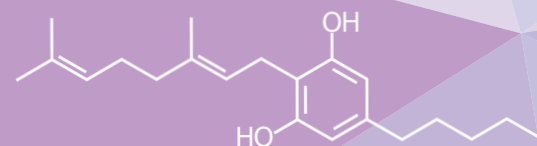
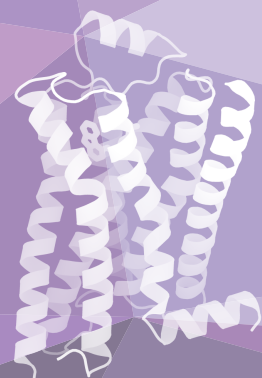
ANÁLISIS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: HACIA UN TRATAMIENTO POLIVALENTE

CRISTINA PALOMO GARO

CRISTINA PALOMO GARO TESIS DOCTORAL UCM 2016



TESIS DOCTORAL
UCM
NOVIEMBRE 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**ANÁLISIS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: HACIA
UN TRATAMIENTO POLIVALENTE**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Cristina Palomo Garo

Bajo la dirección de
Dra. M^a Concepción García García
Dr. Javier Fernández-Ruiz

MADRID, 2016

M^a CONCEPCIÓN GARCÍA GARCÍA, Doctora en Biología e Investigadora en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid y en el Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

JAVIER FERNÁNDEZ-RUIZ, Catedrático en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Análisis del Sistema Endocannabinoide en la Enfermedad de Parkinson: hacia un tratamiento polivalente” presentada por Cristina Palomo Garo, Licenciada en Bioquímica, para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para ser juzgada.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firman el presente certificado:

Dra. M^a Concepción García García

Dr. Javier Fernández-Ruiz

En Madrid a 9 de Septiembre de 2016

*I'm only happy when it rains
I'm only happy when it's complicated
And though I know you can't appreciate it
I'm only happy when it rains*

*I'm only happy when it rains
I feel good when things are goin' wrong
I only listen to the sad, sad songs
I'm only happy when it rains*

*I only smile in the dark
My only comfort is the night gone black
I didn't accidentally tell you that
I'm only happy when it rains*

Garbage

*A mi padre Julián y a mi madre Juani,
por su apoyo incondicional.
A mi hermana Verónica, por ser mi
mejor amiga.*

AGRADECIMIENTOS

Como siempre, lo que más cuesta, se deja para el final. Y en mi caso han sido los agradecimientos. Durante la escritura de esta Tesis me he ido acordando de tantas situaciones, tantas anécdotas... momento malos y buenos, pero me quedaré con los buenos.

A los primeros que quiero agradecer el haberme dado la oportunidad de hacer el doctorado es a mis directores, Conchi y Javier. Ha costado, pero al final ha salido adelante. De Javier siempre me asombrará su capacidad para estar a mil y una cosas y aún así seguir conservando esa memoria de elefante. De Conchi admiro su perseverancia, ahora te toca disfrutar de esta nueva etapa en tu vida, porque te mereces que las cosas te vayan saliendo bonito de una vez.

Si pienso en la gente del labo, la primera que me viene a la cabeza es Yolanda, el pegamento que nos mantiene a todos unidos, sin ti iríamos por la vida como pollitos sin cabeza, gracias por tu cariño y tu sabiduría. Onintza, a pesar de ser sólo compañeras de trabajo (que no amigas) nos quedan muchos *cuxcuxeos* que compartir, tú fuiste la primera que me acogió en el Huntington Team, y eso deja huella (por dentro y por fuera, claro). Eva, tienes una misión en esta vida, salvar al labo del holocausto tecnológico. Ruth, conocerte es quererte automáticamente. Carmen, ¡cómo pasa el tiempo! Parece que fue ayer cuando hablábamos en el murete de Químicas sobre empezar a colaborar en un laboratorio, y miranos ahora. Gracias por tantos buenos momentos y tantas vivencias. Miki, ¿qué te voy a decir que no nos hayamos dicho ya? Muchas gracias por ser mi confidente dentro y fuera del laboratorio, por la complicidad y la malicia compartida. Ya sabes, como el buen vino. Para Sara y Mery no tengo palabras, tan majas, tan valientes, tan cabales... os adoro, a partir de ahora os vais a comer el mundo, porque sois unas fuera de serie. Sara, mil gracias por arrastrarme a todas las actuaciones de la escuela, has creado un monstruo. Mery, gracias por tus terapias en *Cuéntaselo a Mery*. Tampoco se queda atrás en *adorabilidad* Valentina, disfruta de cada momento en Madrid como ya estás haciendo. Laura, gracias por llenar el tiempo de anécdotas (y de *defichentes*), deberías escribir un libro. Mairon, es una pena no haber disfrutado más de tu chispa, porque eres un diamante en bruto. Marta, tú vales mucho, aprovecha el impulso, porque llegarás lejos. Minioli, que de *mini* no tiene un pelo, sí que se fue lejos, has dejado huella en nosotros con tu sabiduría, ojalá yo hubiese tenido la mitad de valentía en la vida que tú. Fran, aunque seamos inmiscibles, gracias por tu disposición a ayudar en cualquier momento. Sois unos grandes investigadores y os doy las gracias por haber hecho inolvidable esta etapa de mi vida. Junto con Moisés, María, Mari Luz, los *peques* Irene, Xaloc, Cris, Eva Luna, Sara, Sonia, (y los que vendrán), además de Luis, gracias *jefe consorte* por aguantar todo este tiempo al Parkinson Team, Pedro, gracias por vuestras barbacoas, etc, etc... hemos formado una pequeña gran familia.

Le quiero agradecer especialmente a José Antonio sus lecciones, que alguien te diga a la cara lo que no quieres oír, ayuda a mejorar, aunque nos fastidie.

Una parte de esta Tesis la realicé en el Instituto Cajal y me gustaría agradecer a Charo Moratalla su dirección, y a su laboratorio toda la ayuda que me prestaron, en especial a Isabel. Eres una persona excepcional, siempre con la sonrisa en la cara y dispuesta a ayudar, no cambies en nada.

También me tiré bastantes horas en VISAVET, y me gustaría agradecer a María Mazariegos, Laura Delgado, Pedro... que me acogieran y me trataran como una compañera más incluso con el ébola de por medio.

Llegados a este punto y siguiendo en el ámbito científico, quiero agradecer a la SEIC el haber vivido experiencias inolvidables en los congresos, haber conocido a los Manolos, a los Alcorconitas, a los de Iron Door, a los Maldonados... Especialmente a los Maldonados, con los que la familia cannábica ha traspasado fronteras, Xavi Nadal, Xavi Viñals, María, Alba, y especialmente Laura y Arnau, sois *molt, molt macus* y ya estamos retrasando nuestra quedada anual.

Aquí llega el momento de una mención especial a Giulio Ragusa, no sabía dónde meterte, en el labo, la SEIC,... ¡si hemos sido hasta compañeros de piso! Te echo de menos por tus bromas, tus cariños... el núcleo necesita a su tercer presidente.

Durante la escritura también me he acordado de muchos momentos vividos durante la carrera en los que estaban presentes Couso, Ara, Cossi y Raquel (pero a vosotras dos os dejo para más adelante)... Sois unos grandes y me encantáis. Os echo de menos en Madrid.

¿Cómo no les iba a agradecer a ellas el haberme aguantado tanto tiempo? A ellas, Mis Amigas, con mayúsculas, porque ya me lo dijisteis "*Esta Tesis también es nuestra*". La de vueltas que da la vida, y si nos encontramos, fue por algo. Noe, amiga, compañera, confidente, maestra... gracias por estos años de escucharme, de elaborar teorías locas, decirnos verdades con más o menos tacto, darme cariño... aunque a veces seas un poco inflamable, te quiero. Cossi, gracias por darme ánimos, por poner buena cara siempre, por no perder la sonrisa. Almu, hay pocas personas tan buenas como tú, gracias por tu comprensión, cariño y hacerme reír. Raquel, gracias por ser tan payasa, te mereces ser feliz. Voy a meter en este saco también a María y a Mar, porque fueron el gran hallazgo de los últimos años, seguid tan auténticas. Chicas, volveremos a ser vecinas, es mi primer propósito del 2017.

Y hablando de vecinos, cómo no agradecer todo el apoyo que me han dado mis *compis* de piso, con todas las anécdotas que siempre recordaré, todas las risas que nos hemos echado y todas las cosas que me habéis enseñado. Gracias Cris Sodapop, Alejandro, Paco y Tamara. Aunque no lo sepan, muchas de esas anécdotas y risas se las debemos al Elefante y a Mario, pero eso no se lo vamos a agradecer.

Lo bueno de ser un laboratorio lleno de tanta gente maja, es que los grupos de amistades se entremezclan, y así me presentaron a los del Cineclub, conozco poca gente que sea tan auténtica como vosotros (y aquí José Quevedo me dará una lección vital como sólo él sabe hacer). Gracias Oriol, Hero, Paula, Javito, Nacho, Nick, Hetor, Alberto,...

También se entremezclan los grupos de la biblio, erasmus, veterinarios, biólogos, segovianos... Gracias a Raquel, María Toronto, Pedro, Laura, Sarah, Andrés, Joserra, Diego, Cris, Fer, Juli Ju, Tomás, Belén, Fran, Rosela, Juanco, Galin, Jorge, Julia, Ramiro, Lorena, Lucía, León, Llorens, Marina, etc, etc... por haberme acompañado en este viaje.

Especialmente tengo que darle las gracias a Anita por haber hecho terapia conmigo, eres una persona deslumbrante. Gracias también por haberme descubierto el mundo de la danza. Mi vida *cambió de diagonal* cuando me llevaste de la manita a la escuela de Morgana. A ella, y a las demás bailarinas de Morgan East&West tengo que agradecer que durante las clases y ensayos, consigan que me olvide del mundo exterior.

No es que el poro fuera muy fino, es que tú estabas allí obstruyendo el filtro. Mr. Planck, he de agradecerte tu eterna paciencia, tus mimos, tu ayuda, el decirme las cosas con tacto, el haber vivido de nuevo otra Tesis... Porque a partir de ahora te lo podré devolver todo en forma de viajes, cenas, siestas, libros en la playa, cervezas, risas, hoteles bajo mil estrellas, comilonas y más risas.

Llegando al final, por ser los más importantes, gracias a mis padres y a mi hermana. Gracias por haberme apoyado estos años, y seguir haciéndolo. Gracias, porque estoy orgullosa de formar parte de esta familia, para mí, excepcional. Gracias por convertir cada comida familiar en un ataque de risa. Vosotros sí que os merecéis lo mejor en la vida, y mucho más. Iván gracias por ser tan buena persona y aguantarnos, ahora Miguel y tú también formáis parte del clan.

Por si no ha quedado claro, os quiero a todos con locura, aunque ya sabéis que no soy mucho de decirlo.

ACRÓNIMOS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ACEA	araquidonoil-2-cloroetilamida
ACPA	araquidonoilciclopropilamida
ADN	ácido desoxirribonucleico
AEA	<i>N</i> -araquidonoiletanolamina o anandamida
AIM	movimientos anormales involuntarios, del inglés <i>abnormal involuntary movements</i>
ALDH1A1	aldehído deshidrogenasa 1A1
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de la varianza
AP	anteroposterior
ARA-S	<i>N</i> -araquidonilserina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosin trifosfato
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro, del inglés <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CB₁	receptor cannabinoide de tipo-1
CB₂	receptor cannabinoide de tipo-2
CBD	cannabidiol
CBD-BDS	extracto botánico enriquecido en cannabidiol, del inglés <i>CBD-botanical extract</i>
CBG	cannabigerol
CBN	cannabinol
COX	ciclooxigenasa
DA	dopamina
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAG	diacilglicerol
DAGL	diacilglicerol lipasa
DMSO	dimetilsulfóxido
DV	dorsoventral
EP	Enfermedad de Parkinson
FAAH	amidohidrolasa de ácidos grasos, del inglés <i>fatty acid amido hydrolase</i>
FAK	quinasa de adhesión focal, del inglés <i>focal adhesion kinase</i>
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GBA	β-glucocerebrosidasa
GDNF	factor neurotrófico derivado de células gliales, del inglés <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GPCR	receptor acoplado a proteínas G, del inglés <i>G protein-coupled receptor</i>
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento, del inglés <i>high-performance liquid chromatography</i>
i.c.v.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitoneal
IL	interleuquina
IP3	inositol trifosfato
JNK	quinasa Jun-Nterminal
KPBS	tampón sodio-potasio salino, del inglés <i>potassium phosphate buffered saline</i>
LAMP	proteína de membrana asociada a lisosoma, del inglés <i>lysosome-associated membrane protein</i>
L-DOPA	levodopa, L-3,4-dihidroxifenilalanina

LOX	lipooxigenasa
LPS	lipopolisacárido
LRRK2	proteína quinasa con repeticiones ricas en leucina de tipo 2, del inglés <i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
m.f.b.	tracto prosencefálico medial, del inglés <i>medial forebrain boundle</i>
MAGL	monoacilglicerol lipasa
MAPK	quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i>
ML	mediolateral
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADA	<i>N</i> -araquidonildopamina
NAPE	<i>N</i> -araquidonoil fosfatidiletanolamina
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, del inglés <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
OEA	<i>N</i> -oleiletanolamina
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PEA	<i>N</i> -palmitoiletanolamina
PET	tomografía de emisión de positrones, del inglés <i>positron emission tomography</i>
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	proteína quinasa C
PL	fosfolipasa
PPAR	receptor activado por proliferadores de peroxisomas
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
r.p.m.	revoluciones por minuto
ROS	especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>reactive oxygen species</i>
SEA	<i>N</i> -estearoiletanolamina
SEM	error estándar de la media
SMasa	esfingomielinasa
SNC	Sistema Nervioso Central
SNpc	sustancia <i>nigra pars compacta</i>
STN	núcleo subtalámico
TH	tirosina hidroxilasa
TNF-α	factor de necrosis tumoral α, del inglés <i>tumor necrosis factor α</i>
TRPA	receptor de potencial transitorio activado por anquirina, del inglés <i>transient receptor potential ankyrin</i>
TRPV	receptor vanilloide de potencial transitorio, del inglés <i>transient receptor potential vanilloid</i>
UPS	sistema ubiquitina-proteasoma
VTA	área tegmental ventral
Δ⁹-THC	Δ ⁹ -tetrahidrocannabinol
Δ⁹-THCV	Δ ⁹ -tetrahidrocannabivarina

RESUMEN	19
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	27
Enfermedad de Parkinson	29
Características clínicas	29
Etiología	30
Patogénesis	31
<i>Disfunción mitocondrial</i>	32
<i>Estrés oxidativo</i>	33
<i>Alteración de la proteostasis</i>	35
<i>Inflamación y activación microglial</i>	35
<i>Excitotoxicidad</i>	35
Terapias actuales	35
Disquinesia	36
Investigación actual y líneas prioritarias	37
<i>Modelos genéticos</i>	37
<i>Modelos basados en neurotoxinas</i>	38
Cannabinoides y Sistema Endocannabinoide	39
<i>Cannabis sativa</i> y fitocannabinoides	39
Sistema Endocannabinoide	41
Receptores cannabinoides	41
<i>Receptor CB₁</i>	41
<i>Receptor CB₂</i>	41
<i>Otros receptores con actividad en el Sistema Endocannabinoide</i>	41
Endocannabinoides	43
<i>Síntesis de endocannabinoides</i>	43
<i>Transporte al interior de la célula</i>	45
<i>Degradación</i>	45
Otros ligandos endógenos	45
Farmacología del Sistema Endocannabinoide	46
Agonistas de los receptores cannabinoides	46
<i>Cannabinoides clásicos</i>	46
<i>Cannabinoides no clásicos</i>	47
<i>Aminoalquilindoles</i>	47
<i>Eicosanoides</i>	47
Antagonistas de los receptores cannabinoides	47
Modificadores del tono endocannabinoide	47
Señalización mediada por receptores cannabinoides	48
Procesos fisiológicos mediados por el Sistema Endocannabinoide	50
Modulación de la actividad sináptica por endocannabinoides	50
<i>Señalización retrógrada</i>	50
<i>Comunicación neurona-astrocito</i>	50
Procesos neurobiológicos con participación del Sistema Endocannabinoide	50
<i>Memoria</i>	50
<i>Ansiedad</i>	51
<i>Nocicepción</i>	51
<i>Apetito</i>	51
<i>Émesis</i>	51
<i>Hipotermia</i>	51
<i>Control del movimiento</i>	51
Mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides	52
<i>Efectos antiexcitotóxicos</i>	53
<i>Efectos antiinflamatorios</i>	53
<i>Efecto antioxidante</i>	53
<i>Regulación de factores neurotróficos</i>	54
<i>Efectos sobre la autofagia</i>	54
<i>Efectos neurogénicos</i>	54

Sistema Endocannabinoide en la Enfermedad de Parkinson	55
Reducción de los síntomas a través del receptor CB ₁	56
Reducción de la disquinesia.....	57
Agonistas del receptor CB ₂ para el tratamiento de los eventos inflamatorios.....	58
Cannabinoides antioxidantes para el tratamiento del daño oxidativo.....	58
OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	63
Diseños experimentales	63
Diseño I: Análisis de los cambios en el receptor CB ₂ en la Enfermedad de Parkinson.....	63
<i>Sujetos del estudio</i>	63
<i>Modelos animales utilizados en este diseño experimental</i>	66
Diseño II: Potencial terapéutico de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas.....	67
<i>Neuroprotección con cannabinoides por agonismo CB₂ y capacidad antioxidante</i>	67
<i>Neuroprotección con derivados cannabinoides con actividad sobre PPARγ</i>	67
<i>Efecto de antagonistas CB₁ sobre algunos síntomas de la Enfermedad de Parkinson</i>	68
<i>Efecto de Δ^9-THCV sobre la disquinesia asociada a levodopa en el modelo de ratones aphakia</i>	68
Diseño III: Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con agonistas CB ₂ en el modelo LRRK2-G2019S.....	70
<i>Caracterización neurológica y neuropatológica de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S</i>	70
<i>El receptor CB₂ como diana del tratamiento de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S</i>	71
Métodos experimentales	72
Animales de experimentación.....	72
Lesiones estereotáxicas.....	72
<i>Lesión 6-OHDA en el m.f.b. sobre ratas</i>	72
<i>Lesión con 6-OHDA intraestriatal en ratones</i>	72
<i>Lesión con 6-OHDA i.c.v. en ratas</i>	73
<i>Lesión con LPS intraestriatal en ratones</i>	73
Preparación de los cannabinoides.....	73
Pruebas comportamentales.....	73
<i>Actividad horizontal y vertical</i>	73
<i>Test de la placa caliente</i>	74
<i>Test de la percha o hanging-wire test</i>	74
<i>Test del Rotarod</i>	74
<i>Test del mástil o pole test</i>	74
<i>Análisis de los movimientos anormales involuntarios (AIM)</i>	75
Técnicas histológicas.....	75
<i>Preparación del tejido</i>	75
<i>Tinción de azul de Metileno</i>	75
<i>Técnicas inmunohistoquímicas</i>	75
<i>Técnicas de inmunofluorescencia</i>	76
<i>Microscopía</i>	77
Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real.....	77
Cuantificación del contenido en dopamina por HPLC.....	78
Cuantificación del contenido en glutamato.....	78
Estadística.....	79
RESULTADOS	81
Diseño I: Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson	83
Expresión del receptor CB ₂ asociado a activación glial en la sustancia <i>nigra</i> de pacientes con Enfermedad de Parkinson.....	83
Expresión del receptor CB ₂ asociado a activación glial en modelos animales de Enfermedad de Parkinson.....	85
Expresión del receptor CB ₂ en neuronas de la sustancia <i>nigra</i> . Datos en pacientes con Enfermedad de Parkinson.....	89
Neuroprotección con cannabinoides por agonismo CB ₂ y capacidad antioxidante.....	92

Diseño II: Potencial terapéutico de los cannabinoides en modelos experimentales de la	
Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas	92
Neuroprotección con cannabinoides por agonismo CB ₂ y capacidad antioxidante	92
<i>Neuroprotección con Δ⁹-THCV y HU-308 en ratones lesionados con LPS</i>	92
<i>Neuroprotección con Δ⁹-THCV en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina</i>	95
Neuroprotección con derivados cannabinoides activos sobre PPARγ	96
Efecto de antagonistas CB ₁ sobre algunos síntomas de la Enfermedad de Parkinson	98
<i>Evaluación de la capacidad antagonista CB₁ de Δ⁹-THCV in vivo</i>	98
<i>Efecto de Δ⁹-THCV en la inhibición motora y sobre los niveles de dopamina y glutamato en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina</i>	99
Efecto de Δ ⁹ -THCV sobre la disquinesia asociada a levodopa en el modelo de ratones <i>aphakia</i>	101
<i>Evaluación del Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones Pitx3^{-/-}</i>	101
<i>Efecto de Δ⁹-THCV sobre la aparición y evolución de la disquinesia asociada a levodopa</i>	102
Diseño III: Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con agonistas CB₂	
en el modelo LRRK2-G2019S	107
Caracterización fenotípica y neuropatológica de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S	107
<i>Evaluación de marcadores de parkinsonismo en los ratones transgénicos LRRK2-G2019S</i>	111
<i>Evaluación del Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S</i>	112
El receptor CB ₂ como diana del tratamiento de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S	112
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
ANEXO	173

RESUMEN

SUMMARY

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa crónica con mayor incidencia después de la Enfermedad de Alzheimer, y sus síntomas más característicos son el temblor, la lentitud al realizar movimientos, sobre todo automáticos, la rigidez y la inestabilidad postural. El origen de los síntomas de la EP se debe a una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia *nigra pars compacta* asociada a una denervación dopaminérgica del estriado. En la actualidad, la única terapia eficaz es la de reemplazo dopaminérgico, que tras el uso continuado acaba perdiendo efectividad y provocando disquinesia como efecto secundario. Hasta el momento los únicos tratamientos existentes están enfocados al alivio de los síntomas, pero no se ha encontrado aún un remedio a la muerte neuronal que los provoca.

El Sistema Endocannabinoide está formado por una serie de lípidos endógenos, sus receptores celulares y sus enzimas de degradación y síntesis. Está implicado en multitud de mecanismos de señalización y se ha postulado como diana para el tratamiento de la EP debido a los cambios que sufre durante el transcurso de esta enfermedad, así como por su papel regulador de la inflamación, estrés oxidativo, excitotoxicidad y otros eventos patogénicos.

El principal reto en este momento es el de profundizar en la identificación de los cambios que sufre el Sistema Endocannabinoide durante el transcurso de la EP con el fin de encontrar nuevos posibles biomarcadores, y, sobre todo, identificar dianas farmacológicas y desarrollar nuevas terapias dirigidas no solo al alivio de los síntomas de la enfermedad, sino al retraso de la muerte neuronal que se produce en la sustancia *nigra* de los pacientes.

Así, una de las estrategias a seguir en la terapia de la EP sería encontrar moléculas cannabinoides que posean capacidad para controlar los eventos inflamatorios, principalmente a través de la activación del receptor cannabinoide CB₂ o la familia de los receptores nucleares PPAR, proporcionando neuroprotección, y que alivien síntomas específicos como la bradiquinesia mediante el bloqueo de los receptores CB₁. También sería interesante que tuviesen un perfil antioxidante y posean capacidad para disminuir la lesión oxidativa, actuando como lavadores de especies reactivas de oxígeno o, mejor aún, mediante la activación de las vías endógenas de respuesta antioxidante (Nrf-2, PPAR). Incluso se podría combinar estas moléculas con dosis de L-DOPA menos pro-disquinéticas para seguir conservando el efecto terapéutico de ésta, pero disminuyendo el riesgo de sufrir efectos secundarios.

En el contexto de estos retos se ha diseñado y desarrollado la presente Tesis Doctoral, que se divide en tres diseños experimentales con el fin de alcanzar los objetivos detallados a continuación:

Diseño I: Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson

Como primer objetivo, investigamos los cambios en el receptor CB₂ en los ganglios basales de pacientes y de modelos animales de la EP, centrándonos en la sustancia *nigra* y en el estriado, principales estructuras afectadas en la enfermedad. También investigamos los posibles sustratos celulares en los que se podrían producir estos cambios.

Diseño II: Potencial neuroprotector de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

Como segundo objetivo, analizamos si determinados cannabinoides con capacidad agonista CB₂ y/o antioxidantes y un derivado cannabinoide agonista PPAR γ poseen potencial neuroprotector en modelos experimentales de EP. Además, evaluamos el efecto de determinados antagonistas CB₁ sobre los síntomas típicos de la enfermedad, como la bradiquinesia y la disquinesia.

Diseño III: Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con cannabinoides en el modelo LRRK2-G2019S

El último objetivo consistió en estudiar el Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones del modelo genético de una de las variantes de EP familiar con mayor prevalencia, los ratones transgénicos LRRK2-G2019S. En una segunda parte, evaluamos la acción de dos agonistas CB₂ sobre el desarrollo del fenotipo patológico en estos ratones.

Tras el desarrollo del primer diseño experimental, se pudo confirmar que la expresión del receptor CB₂ estaba elevada en la microglía de la sustancia *nigra* de los pacientes de la EP. Este hecho se ha encontrado en otras enfermedades neurodegenerativas, pero estaba poco estudiado en EP. Esta elevación se reproduce en el modelo experimental animal basado en la lesión inflamatoria con LPS, pero no en el modelo de lesión oxidante con 6-OHDA, lo que sugiere que está asociada principalmente a inflamación. Practicando la lesión con LPS sobre ratones deficientes en el receptor CB₂ pudimos observar que la ausencia de este receptor confiere una mayor vulnerabilidad a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* frente a los estímulos inflamatorios, lo que podría indicar que una activación del receptor CB₂ conllevaría a un efecto neuroprotector.

Otro resultado novedoso de este apartado fue encontrar la presencia de receptores CB₂ en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* humana, siendo esta expresión de menor intensidad en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes afectados por la EP. Aunque la expresión del receptor CB₂ en neuronas ha sido hasta la fecha es un tema controvertido, cada vez son más los defensores de su presencia en subpoblaciones neuronales específicas.

En el segundo diseño experimental comprobamos que los cannabinoides con capacidad agonista CB₂ y/o antioxidante empleados previenen la degeneración dopaminérgica disminuyendo la inflamación en el modelo de lesión con LPS. El cannabinoide sintético VCE-003.2 con capacidad agonista PPAR γ disminuye los síntomas motores y posee cierto grado de neuroprotección en el modelo experimental de lesión con 6-OHDA. En el caso de los cannabinoides con capacidad antagonista CB₁, se disminuyen los síntomas motores en el modelo de lesión con 6-OHDA, presumiblemente mediante la modulación de la actividad glutamatérgica en el estriado, y en la sustancia *nigra*. Por último, el fitocannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabivarina, con capacidad agonista CB₂, antagonista CB₁ y antioxidante, disminuye los efectos motores y los marcadores de disquinesia asociada a levodopa en los ratones del modelo de Parkinson genético *aphakia*.

En el tercer diseño experimental encontramos que los ratones transgénicos del modelo de Parkinson genético *LRRK2-G2019S* muestran un fenotipo motor muy leve, presentando únicamente menor coordinación y fuerza muscular. Mediante el análisis histológico y bioquímico, no observamos que estos cambios estuviesen asociados a daño nigroestriatal o cerebelar, ni inflamación en los ganglios basales, pero sí a un aumento de la autofagia en el estriado y en la sustancia *nigra*. Tras el tratamiento crónico de estos ratones con agonistas CB₂, se observó una mejora de la distonía y una disminución de la autofagia.

Por lo tanto, gracias a estos resultados podemos extraer las siguientes conclusiones:

- El receptor CB₂ se encuentra sobreexpresado en la microglía de la sustancia *nigra* de los pacientes de la Enfermedad de Parkinson y esta sobreexpresión se reproduce en un modelo experimental basado en la lesión proinflamatoria con LPS.
- La activación del receptor CB₂ ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* frente a los estímulos inflamatorios.
- Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* humana expresan receptores CB₂, siendo sus niveles menores en el caso de los pacientes afectados por la Enfermedad de Parkinson.
- Cannabinoides como el Δ^9 -THCV, con capacidad agonista CB₂ y/o antioxidante, previenen la degeneración dopaminérgica disminuyendo la inflamación en el modelo experimental de lesión con LPS.
- El cannabinoide sintético VCE-003.2 con capacidad agonista PPAR γ disminuye los síntomas motores y posee cierto efecto neuroprotector en el modelo experimental de 6-OHDA.
- Los cannabinoides con capacidad antagonista CB₁ disminuyen los síntomas motores en el modelo de lesión con 6-OHDA, a través de un efecto independiente de dopamina pero relacionado con la actividad glutamatérgica en los ganglios basales.
- El fitocannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabivarina disminuye los efectos motores y los marcadores

de disquinesia asociada a levodopa, en los ratones del modelo de Parkinson genético *aphakia*.

- Los ratones transgénicos del modelo de Parkinson genético *LRRK2-G2019S* muestran un fenotipo motor muy leve, presentando únicamente menor coordinación y fuerza muscular. Estos cambios no están asociados a daño nigroestriatal o cerebelar, ni inflamación en los ganglios basales, pero sí a un aumento de la autofagia en estriado y sustancia *nigra*.

- El tratamiento de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* con agonistas CB₂ mejora la distonía y disminuye la autofagia.

Parte de los resultados recogidos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados como artículos científicos en revistas indexadas. Son los siguientes y se pueden consultar en el ANEXO:

- García, C., C. Palomo-Garo, M. García-Arencibia, J. Ramos, R. Pertwee and J. Fernández-Ruiz (2011). "Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease." *Br J Pharmacol* 163(7): 1495-1506.
- García, M. C., V. Cinquina, C. Palomo-Garo, A. Rábano and J. Fernández-Ruiz (2015). "Identification of CB(2) receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease." *Neurosci Lett* 587: 1-4.
- Gómez-Gálvez, Y., C. Palomo-Garo, J. Fernández-Ruiz and C. García (2016). "Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 200-208.
- Palomo-Garo, C., Y. Gómez-Gálvez, C. García and J. Fernández-Ruiz (2016). "Targeting the cannabinoid CB2 receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice." *Pharmacol Res* 110: 181-192.

Summary

Parkinson's disease (PD) is the second most common chronic neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and its most characteristic symptoms are tremor, slowness to perform movements, rigidity and postural instability. Symptoms of PD are caused by a progressive loss of dopaminergic neurons located in the substantia *nigra pars compacta* which decreases dopamine levels in the striatum. At the present time, the only therapy is dopamine replacement, which causes effectiveness and a long-term side effect called dyskinesia. So far, the existing treatments are aimed at relieving symptoms but has not yet found a remedy to the neuronal death.

The endocannabinoid system includes the endogenous cannabinoids and their synthetic and degradative enzymes. It is involved in multiple signaling pathways and has been postulated as a target for the treatment of PD due to the changes experienced during the course of this and other neurodegenerative diseases and its regulatory role in inflammation that occurs in these diseases.

In research, it is necessary to identify the changes that the endocannabinoid system exhibits during the course of the PD, in order to find new biomarkers and new therapeutic targets and treatments aimed at developing new drugs, not only for alleviation of the symptoms, but for delay neuronal death.

So, one of the strategies in the therapy of PD would be to find cannabinoid molecules that have ability to control inflammatory events, primarily through activation of cannabinoid receptor CB₂ or the PPAR nuclear receptors family, providing neuroprotection and alleviating specific symptoms such as bradykinesia by blocking CB₁ receptors. It would be also interesting a cannabinoid with an antioxidant profile and ability to decrease oxidative damage. Even these molecules could be combined with less pro-dyskinetic doses of L-DOPA, preserving its therapeutic effect and decreasing the side effects risk.

The present PhD. Thesis is divided into three experimental designs in order to achieve the aims

detailed below:

Design I: Analysis of changes in the CB₂ receptor in Parkinson's Disease

As a first aim, we investigated whether the CB₂ receptor was expressed in the basal ganglia of animal models and patients of PD, focusing on the substantia *nigra*, the main affected brain structure in this disease. If so, we would identify the cell types in which would be present, and if receptor levels are affected.

Design II: Neuroprotective potential of cannabinoids in experimental models of Parkinson's disease and its effect on symptoms

As a second aim, we analyzed whether certain cannabinoids with CB₂ agonist capacity and/or antioxidants, and a PPAR γ agonist synthetic cannabinoid have neuroprotective potential. In addition, we evaluated the effect of CB₁ antagonists on the typical symptoms of the disease as bradykinesia, and dyskinesia. Both strategies addressed in animal models of PD.

Design III: Characterization of the endocannabinoid system and treatment with cannabinoids in LRRK2-G2019S model

The last aim was to study the endocannabinoid system in the basal ganglia of a genetic model of one of the most prevalent variants of familial PD, LRRK2-G2019S transgenic mice. And also evaluate the action of two CB₂ agonists in these mice.

After the development of the first experimental design, we found that CB₂ receptor expression on microglia increases on the substantia *nigra* of Parkinson's Disease patients. This fact has been found in other neurodegenerative diseases, but it was poor studied in PD. This elevation is reproduced in an experimental animal model based on the inflammatory lesion with LPS, but not in the oxidative 6-OHDA lesion model. Studying the effect of the lesion with LPS on CB₂ receptor deficient mice, we found that the absence of this receptor increases the vulnerability of dopaminergic neurons against inflammatory stimuli, which could indicate that CB₂ receptor activation would lead to a neuroprotective effect.

Another new result of this section was to find the presence of CB₂ receptors in dopaminergic neurons of human substantia *nigra*, this expression has a lower intensity in dopaminergic neurons of patients with Parkinson's Disease compared with healthy controls. While CB₂ receptor expression in the brain is a controversial issue, there are more and more defenders of their presence in regions and/or specific neuronal subpopulations.

During the second experimental design we found that cannabinoids with CB₂ agonist and/or antioxidant capacity prevent the dopaminergic depletion by decreasing the inflammation in the LPS lesion model. The synthetic cannabinoid PPAR γ agonist VCE003.2 decreases motor symptoms and has a certain neuroprotection capacity in the experimental model of 6-OHDA lesion. In the case of CB₁ antagonist cannabinoids, motor symptoms were reduced in the 6-OHDA lesion model, presumably through increasing glutamate content in the striatum, and a decreasing it in the substantia *nigra*. Lastly, the phytocannabinoid Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin, with CB₂ agonist, CB₁ antagonist capacity and antioxidant, decreases motor effects and dyskinesia biomarkers associated, in a genetic model of PD.

In the third experimental design, we found that transgenic mice of LRRK2-G2019S genetic PD show a very mild motor phenotype, showing only decreased coordination and muscle strength. By histological and biochemical analysis, we observed that these changes were not associated with nigrostriatal or cerebellar damage, or inflammation in the basal ganglia, but to an increase in autophagy in striatum and substantia *nigra*. After chronic treatment of these mice with CB₂ agonists, they showed an improvement of dystonia and decreased autophagy.

Therefore, after these results we show the following conclusions:

- CB₂ receptor expression is increased in the microglia of the substantia *nigra* of patients of Parkinson's Disease, and this elevation is reproduced in the animal model based on the LPS

lesion.

- The CB₂ receptor confers neuroprotective defense to dopaminergic neurons of the substantia *nigra* against inflammatory stimuli.
- Dopaminergic neurons of human substantia *nigra* express CB₂ receptors, with a lower intensity in the case of patients affected by Parkinson's Disease.
- CB₂ agonist and/or antioxidant capacity cannabinoids prevent dopaminergic depletion by decreasing inflammation in the experimental model of LPS lesion.
- The PPAR γ agonist synthetic cannabinoid decreases motor symptoms and has a neuroprotective effect in the experimental model of 6-OHDA.
- CB₁ antagonist cannabinoid decrease motor symptoms in the model of 6-OHDA lesion, presumably by increasing the content of glutamate in the striatum, and decreasing it in the substantia *nigra*.
- The phytocannabinoid Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin reduces motor symptoms and biomarkers of dyskinesia associated with levodopa, in a genetic experimental model of PD.
- LRRK2-G2019S transgenic mice show a very mild motor phenotype, showing only minor coordination and muscle strength. These changes are not associated with nigrostriatal or cerebellar damage, or inflammation in the basal ganglia, but to an increase in autophagy in striatum and substantia *nigra*.
- Treatment of LRRK2-G2019S transgenic mice with CB₂ agonists improves dystonia and decreases autophagy.

Part of the results in this PhD thesis have been published as scientific papers in indexed journals and can be found in the ANEXO:

- García, C., C. Palomo-Garo, M. García-Arencibia, J. Ramos, R. Pertwee and J. Fernández-Ruiz (2011). "Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease." *Br J Pharmacol* 163(7): 1495-1506.
- García, M. C., V. Cquina, C. Palomo-Garo, A. Rábano and J. Fernández-Ruiz (2015). "Identification of CB(2) receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease." *Neurosci Lett* 587: 1-4.
- Gómez-Gálvez, Y., C. Palomo-Garo, J. Fernández-Ruiz and C. García (2016). "Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64: 200-208.
- Palomo-Garo, C., Y. Gómez-Gálvez, C. García and J. Fernández-Ruiz (2016). "Targeting the cannabinoid CB2 receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice." *Pharmacol Res* 110: 181-192.

INTRODUCCIÓN



Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa crónica más extendida después de la Enfermedad de Alzheimer y sus síntomas más característicos son el temblor, la lentitud al realizar movimientos, sobre todo automáticos (bradiquinesia, aquinesia), la rigidez y la inestabilidad postural. Fue denominada como una *parálisis agitante* en 1817 por el Dr. James Parkinson (Parkinson, 1817), pero en 1886 Jean-Martin Charcôt, fundador de la Neurología moderna, la rebautizó como *Enfermedad de Parkinson* al advertir que sus pacientes sufrían rigidez en lugar de parálisis (Charcôt, 1872). Tuvieron que pasar más de cien años hasta que Arvid Carlsson estableció las bases neuroquímicas de esta enfermedad, cuando descubrió que la dopamina (DA) actuaba como neurotransmisor (Carlsson *et al.*, 1957) y que estaba significativamente disminuida en el cerebro de pacientes de EP, en particular en el cuerpo estriado y en la sustancia *nigra* (Carlsson *et al.*, 1958). Estos descubrimientos hicieron que se desarrollaran otros estudios que ayudaron a esclarecer que el origen de los síntomas de la EP se debían a una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la sustancia *nigra pars compacta* (SNpc) que origina la progresiva denervación dopaminérgica del estriado (Ehringer y Hornykiewicz, 1960). Después de estos descubrimientos, se empezó a utilizar la terapia de reemplazo dopaminérgica con el precursor de la DA, levodopa (L-DOPA; L-3,4-dihidroxifenilalanina), para aliviar los síntomas motores de la enfermedad (Birkmayer y Hornykiewicz, 1961). Aunque hay pacientes que no responden bien a esta terapia, la levodopa incrementó notablemente la calidad de vida de los pacientes en los que sí es efectiva, pero pasados unos años de tratamiento, estos empiezan a desarrollar movimientos involuntarios denominados *disquinesias* (Marsden y Parkes, 1977). En la actualidad, los únicos tratamientos existentes están enfocados al alivio de los síntomas pero no se ha encontrado aún un remedio a la muerte neuronal que los provoca.

Características clínicas

La EP es una enfermedad degenerativa progresiva que se hace patente a partir de una edad media de 55 años y cuyos síntomas empeoran con el tiempo. Aproximadamente el 90% de los casos son *esporádicos*, es decir, sin una causa genética hereditaria. Antes de la existencia de la terapia con L-DOPA, la mortalidad de los pacientes era tres veces mayor que el resto de la población de la misma edad y aunque este medicamento ha mejorado cualitativamente su día a día, la esperanza de vida sigue siendo menor que la de la media del resto de población (D'Amelio *et al.*, 2006).

Clínicamente, cualquier afección que incluya déficit estriatal de DA o daños en el estriado puede conducir a *parquinsonismo*, un síndrome caracterizado por temblor en reposo, rigidez, lentitud o ausencia de movimientos voluntarios, inestabilidad postural y la incapacidad para iniciar un movimiento. La EP es la causa más común de parquinsonismo, responsable

de aproximadamente el 80% de los casos (Sveinbjornsdottir, 2016).

En la EP, el temblor ocurre en reposo pero disminuye con la realización de movimientos voluntarios, por lo que normalmente no afecta a las actividades diarias. La rigidez se refiere a la resistencia al movimiento pasivo de las extremidades del paciente. También manifiestan otros síntomas como bradiquinesia (lentitud de movimiento), hipoquinesia (reducción de la amplitud de movimiento), o aquinesia (ausencia de movimientos inconscientes regulares, tal como el braceo al andar), incluyendo la escasez de expresión facial normal (hipomimia), disminución del volumen de la voz (hipofonía), babeo (fallo al tragar sin pensar en ello), reducción del tamaño de la letra (micrografía) y de la velocidad al escribir a mano, y disminución de la longitud de la zancada al caminar. Los pacientes también suelen adoptar una postura encorvada y perder reflejos, por lo que pueden sufrir caídas y generalmente acaban confinados a una silla de ruedas. Un síntoma típico, que

sirve para diferenciar la EP de otras afecciones que cursan con aquinesia, es la *congelación* que sufren los pacientes al intentar iniciar un movimiento voluntario, como por ejemplo, cruzar la calle. Los trastornos afectivos y cognitivos también ocurren frecuentemente; los pacientes mantienen una actitud pasiva o permanecen retirados, sin iniciativa, en silencio, hasta que son animados a participar en las actividades. Es común que las preguntas se respondan con retraso y que los procesos cognitivos se vuelvan lentos. La depresión es común, y la demencia es frecuente en pacientes con EP de edad avanzada (Sveinbjornsdottir, 2016).

Etiología

La causa de la EP es desconocida por el momento. Menos del 10% de los casos son debidos a factores genéticos y se denomina *parquinsonismo familiar*. El otro 90% se denomina *parquinsonismo esporádico* o *idiopático*, y parece ser debido sobre todo a factores ambientales, pero también a cierta predisposición genética. Aunque la hipótesis de que la enfermedad era provocada por una toxina ambiental fue dominante durante el Siglo XX debido a la epidemia de encefalitis letárgica y los casos de EP inducidos por el subproducto de la síntesis de heroína 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), con el descubrimiento de varios genes causantes de la enfermedad, se empezó a pensar en una susceptibilidad hereditaria. Hoy en día se asume que ambos factores pueden estar relacionados (Dauer y Przedborski, 2003).

La hipótesis ambiental postula que la neurodegeneración resulta de la exposición a una neurotoxina que daña específicamente las neuronas dopaminérgicas. Teóricamente, la neurodegeneración progresiva de la EP se debería a una exposición continuada a esta toxina o por una exposición limitada que iniciaría una cascada de eventos perjudiciales. Las personas que desarrollaron un síndrome idéntico a la EP tras su intoxicación con MPTP (Langston *et al.*, 1983), serían un caso prototípico de cómo un agente exógeno puede provocar la enfermedad. Se supone que la población rural está más expuesta a sufrir la enfermedad (Tanner, 1992) por el uso de pesticidas y herbicidas como el paraquat, estructuralmente similar al metabolito activo del MPTP 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), y la rotenona, que se sabe que se comportan como toxinas mitocondriales (inhibidores del

complejo I). Otros estudios niegan que haya una relación entre la exposición a una toxina específica y la aparición de EP esporádico basándose en que el catión amonio cuaternario del paraquat no permitiría a la molécula atravesar la barrera hematoencefálica o que la rotenona sólo es estable en disolución durante muy pocos días (Hisata, 2002). Sin embargo, la enfermedad ha podido ser modelizada en animales de laboratorio utilizando tanto rotenona como paraquat.

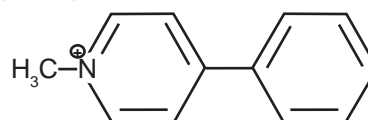


Figura 1. Estructura química del MPP⁺, metabolito activo del MPTP.

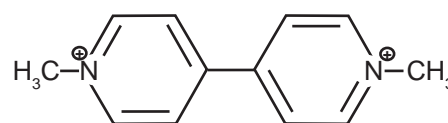


Figura 2. Estructura química del paraquat

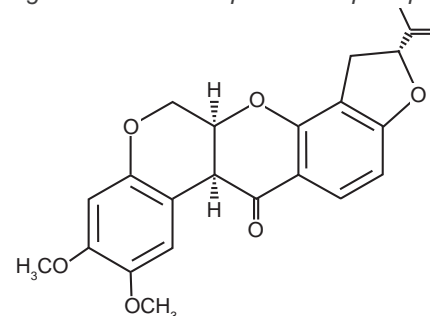


Figura 3. Estructura química de la rotenona

Respecto al Parquinsonismo familiar, en 1997 se identificó por primera un gen mendeliano cuya mutación puntual provocaba la enfermedad, concretamente el gen *SNCA* (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Desde entonces, se han identificado casi una veintena de *loci* implicados en EP familiar, parquinsonismo y síndromes donde el parquinsonismo está predominantemente presente (Hardy *et al.*, 2009)(Tabla 1). Lo interesante de estos genes parquinsonianos es que han permitido profundizar en los procesos afectados en la EP a partir de una mutación en un gen específico y trasladar esa información a los casos esporádicos (Dauer y Przedborski, 2003). Se puede decir que los genes parquinsonianos implican alteraciones en los siguientes procesos, también encontrados en los casos esporádicos (van der Brug *et al.*, 2015):

- Alteración de la proteostasis con proteínas mal plegadas y acumulación de agregados proteicos (por ejemplo; Parkina y *UCH-L1*)

- Defectos en la fosforilación de ciertos sustratos, incluyendo quinasas (*PINK1*, *LRRK2*)
- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (*PINK1*, *DJ-1*)

Más recientemente, gracias a los estudios genómicos a gran escala, se han identificado otros *loci* relacionados con el riesgo de sufrir EP mediante el contraste de miles de análisis poblacionales. Aunque este riesgo sea bajo, el conocimiento de nuevas vías implicadas en la muerte neuronal supone que se puedan desarrollar nuevos fármacos para bloquearlas (van der Brug *et al.*, 2015). Se ha conseguido construir un mapa genético global que relaciona variaciones genéticas poco frecuentes pero de alto riesgo, como las presentes en *SNCA* y *LRRK2*, pasando por variaciones más frecuentes, de alto riesgo pero que no son la causa directa de la enfermedad, como las sufridas por *GBA* y *LRRK2*, hasta las de alta frecuencia pero bajo riesgo de *SNCA*, *MAPT*, *LRRK2* y en el locus *HLA* (Figura 4)(International Parkinson Disease Genomics Consortium *et al.*,

2011). Llama la atención que existan *loci* que abarquen todo el espectro de frecuencia de los alelos de riesgo y severidad, como por ejemplo, algunas mutaciones puntuales en *LRRK2* son causativas de la enfermedad, mientras que los polimorfismos del gen son factores de riesgo elevado y otras variaciones de mayor frecuencia confieren un riesgo menor de desarrollar EP (Paisán-Ruiz *et al.*, 2013).

Este tipo de análisis a gran escala podría servir, por ejemplo, como base del desarrollo de un *test* genético de diagnóstico.

Patogénesis

Al margen del origen genético, ambiental o la interacción entre ambos, las características patológicas comunes de la EP son la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales y la presencia de inclusiones intracelulares denominadas *cuerpos de Lewy*. Estos agregados proteicos están formados principalmente por α -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1998), neurofilamentos (Goldman *et al.*, 1983) y ubiquitina (Kuzuhara *et al.*, 1988).

Locus	Cromosoma	Gen	Herencia	Características
<i>PARK1</i>	4q21-q23	<i>SNCA</i> (mutación puntual)	AD	PD atípico. Cuerpos de Lewy
<i>PARK2</i>	6q25.2-q27	<i>PARK2</i>	AR	PD juvenil
<i>PARK3</i>	2p13	<i>PARK3</i>	AD	PD familiar y esporádico. Cuerpos de Lewy
<i>PARK4</i>	4p14-16.3	<i>SNCA</i> (mutaciones múltiples)	AD	Cuerpos de Lewy
<i>PARK5</i>	4p14	<i>UCH-L1</i>	AR	Atrofia ocular, inicio infantil
<i>PARK6</i>	1p35-p36	<i>PINK1</i>	AR	Susceptibilidad de sufrir PD de inicio temprano
<i>PARK7</i>	1p36.33-p36.12	<i>DJ-1</i>	AR	PD de inicio temprano
<i>PARK8</i>	12p11.23-q13.11	<i>LRRK2</i>	AD	PD familiar de inicio tardío y PD esporádico. Pueden aparecer cuerpos de Lewy
<i>PARK9</i>	1p36	<i>ATP13A2</i>	AR	Síndrome Kufor-Rakeb y lipofuscinosis ceroides neuronal 12
<i>PARK10</i>	1p32	<i>PARK10</i>	?	
<i>PARK11</i>	2q36-q37	<i>GIGYF2</i>	?	Susceptibilidad de sufrir PD
<i>PARK12</i>	Xq21-q25	<i>PARK12</i>	ligada al cromosoma X	
<i>PARK13</i>	2p12	<i>HTRA2</i>	?	
<i>PARK14</i>	18q11	<i>PLA2G6</i>	?	
<i>PARK15</i>	22q12-q13	<i>FBXO7</i>	AR	PD de inicio temprano
<i>PARK16</i>	1q32	<i>PARK16</i>	?	

Tabla 1. Genes asociados a la Enfermedad de Parkinson. La tabla resume las localizaciones cromosómicas de los *loci* "PARK" definidos en la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). AD; autosómica dominante, AR; autosómica recesiva, ?; no determinado.

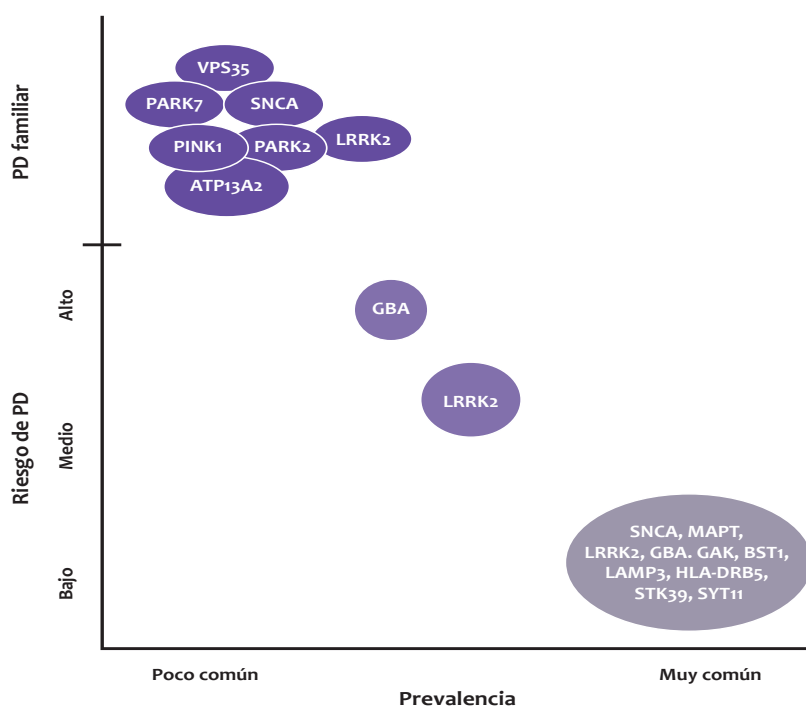


Figura 4. Mapa genético de la Enfermedad de Parkinson. Se han encontrado al menos 17 mutaciones autosómicas dominantes y recesivas responsables de distintas variantes de Parkinson familiar como SNCA, PARK2, y PINK1. En el Parkinson esporádico se han revelado 14 genes, los de alto riesgo incluyen a LRRK2 y variantes de GBA, y los de bajo riesgo como GAK y HLA-DRB5, pero de gran prevalencia. Algunos genes como LRRK2 se encuentran en todas las categorías. P. HUEY/SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE (van der Brug et al., 2015).

Los cuerpos celulares de las neuronas nigroestriatales están en la SNpc, y proyectan, entre otras estructuras, al *putamen*. Estas neuronas contienen cantidades visibles de neuromelanina, de color negro (Marsden, 1983), por lo que al morir, se produce la despigmentación típica encontrada en estudios *post mortem*. Se estima que los síntomas se hacen visibles cuando los niveles de DA disminuyen un 80% en el *putamen* dorsolateral, lo que significa una elevada denervación de esta estructura, y cuando la muerte neuronal en la SNpc está bastante extendida y alcanza el 60%, hecho que dificulta el diagnóstico preventivo de la enfermedad (Bernheimer et al., 1973). Durante la fase subclínica se produce un mecanismo compensatorio tanto en los ganglios basales como en otras áreas cerebrales para suplir la falta de DA (Bezard et al., 2003). Más adelante también degeneran neuronas no-dopaminérgicas, como la vía colinérgica del núcleo basal de Meynert, las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (asociándose a la aparición de demencia y depresión) y las neuronas secretoras de hipocretina del hipotálamo (Braak et al., 2003).

En la **vía directa**, las neuronas espinosas medianas del estriado producen una inhibición GABAérgica del globo pálido interno y la sustancia *nigra pars reticulata*, que a su vez inhibe el tálamo, cuya función es excitatoria sobre la corteza frontal, traduciéndose en la ejecución del movimiento. La función de la **vía indirecta** es la contraria y normalmente está inhibida por la sustancia *nigra pars reticulata*. Al activarse,

las proyecciones GABAérgicas inhiben al núcleo subtalámico, que estaría controlando al globo pálido interno y la corteza frontal, produciendo un cese del movimiento.

Muchos de los mecanismos por los que se cree que degeneran las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales están interconectados entre sí actuando de manera concertada, lo que sin duda tiene que influenciar el diseño de futuras estrategias neuroprotectoras que deben basarse en una farmacología multifactorial (Youdim et al., 2007). Entre estos mecanismos destacan los siguientes:

Disfunción mitocondrial

La primera evidencia de disfunción mitocondrial encontrada en la EP fue la inhibición del complejo I (Schapira et al., 1990), y poco después, de una de las enzimas clave del ciclo de Krebs, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Mizuno et al., 1994) en la sustancia *nigra* de pacientes con la enfermedad. También se ha visto una alteración de la función mitocondrial en casos de EP familiar con mutaciones en α -sinucleína, parkina, PINK1 y DJ-1 y tal vez LRRK2 (Schapira, 2008, Schapira y Jenner, 2011)(ver Figura 6). En concreto parkina y PINK1 actúan conjuntamente en la autofagia de las mitocondrias defectuosas, llamada mitofagia (Narendra et al., 2008). La existencia de un déficit en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, junto con la existencia de depósitos de hierro en el cerebro (Gu et al., 1998), que estarían actuando como catalizadores en

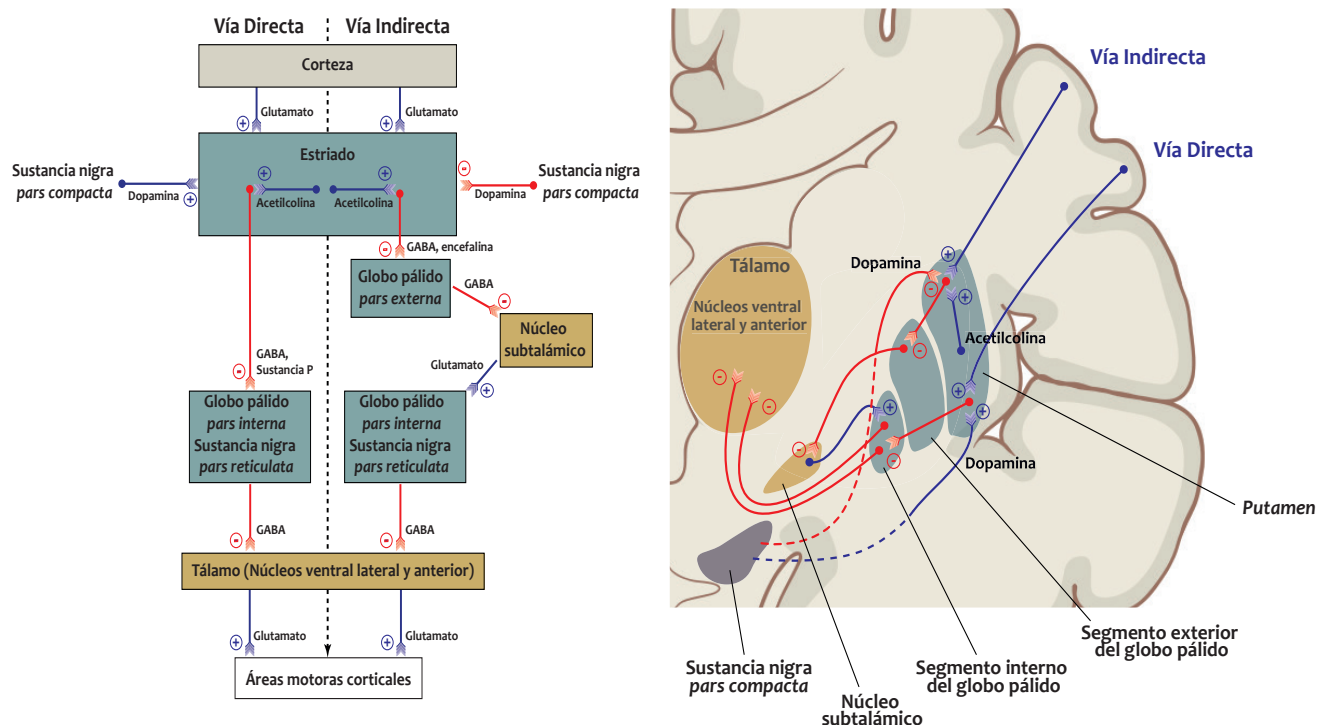


Figura 5. Los ganglios basales reciben la información de la corteza y del tronco encefálico, la procesan y proyectan de nuevo a la corteza, al tronco y a la médula espinal para ejecutar e integrar el movimiento. El estriado recibe diferentes neurotransmisores, principalmente excitatorios y el Globo pálido interno envía proyecciones GABAérgicas hacia la corteza a través de los núcleos ventral lateral y anterior del Tálamo. La dopamina modula los efectos glutamatérgicos de las proyecciones de la corteza ejerciendo un efecto dual sobre las neuronas estriales: activando la vía directa mediante los receptores dopaminérgicos D_1 e inhibiendo la vía indirecta mediante D_2 . Durante la EP, existe una hiperactividad del Núcleo subtalámico, activando al Globo pálido interno y a la Sustancia nigra pars reticulata, e inhibiendo excesivamente al Tálamo y el sistema motor. El déficit en dopamina reduce la activación de la vía directa y la inhibición de la indirecta, resultando en una sobreactivación de los ganglios basales que lleva a una excesiva inhibición talámica y cortical responsable de la hipoquinesia. Oscilaciones en la actividad de las distintas estructuras justificaría la aparición del temblor (Blumenfeld, 2010).

la reacción de Fenton para la formación de radicales libres (Jomova *et al.*, 2010), explican que las personas afectadas por EP posean una sobreexposición a estrés oxidativo junto con una menor defensa antioxidante.

Estrés oxidativo

Históricamente se ha asociado la muerte de las neuronas dopaminérgicas con el estrés oxidativo producido de la formación de especies tóxicas provenientes de la autooxidación de la DA y la L-DOPA y las vías de formación de neuromelanina (Graham, 1979). El metabolismo de la DA parece un candidato improbable, ya que su oxidación produce peróxido de hidrógeno, menos reactivo que los aniones superóxido o los radicales hidroxilo. Además, no se podría explicar por qué no se afectan otras áreas dopaminérgicas del cerebro o por qué se ven afectadas otras neuronas no-dopaminérgicas (Schapira, 2008). Sin embargo, las deficiencias en las principales enzimas antioxidantes en el cerebro como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, junto con una reducción en los niveles de

glutatión reducido y la menor señalización mediada por Nrf2 (Hornykiewicz y Kish, 1987, Saggi *et al.*, 1989, Sian *et al.*, 1994, Cuadrado *et al.*, 2009), la existencia de peroxidación lipídica (malondialdehído, hidroperóxidos, 4-hidroxinonenal...)(Dexter *et al.*, 1994), oxidación del ADN (8-hidroxiguanosina; Alam *et al.*, 1997) y proteínas oxidadas (carbonilos; Alam *et al.*, 1997), la formación de agregados de α -sinucleína (Tofaris y Spillantini, 2005), la existencia de alteraciones en el metabolismo del hierro y los depósitos de este metal que se forman en la SNpc (Dexter *et al.*, 1991), y otros acontecimientos observados en muestras de pacientes o en modelos experimentales de la EP, son todos indicadores de que el estrés oxidativo en la EP es un hecho real e importante que contribuye notablemente a la patogénesis (Dong *et al.*, 2009, Schapira, 2011), y que además no parece limitarse al cerebro (Kikuchi *et al.*, 2002). El origen de los radicales libres implicados en el estrés oxidativo apunta tanto a fuentes neuronales como gliales, procedentes de un malfuncionamiento mitocondrial y, tal vez, del retículo endoplásmico (Surmeier, 2007, Schapira y Jenner, 2011).

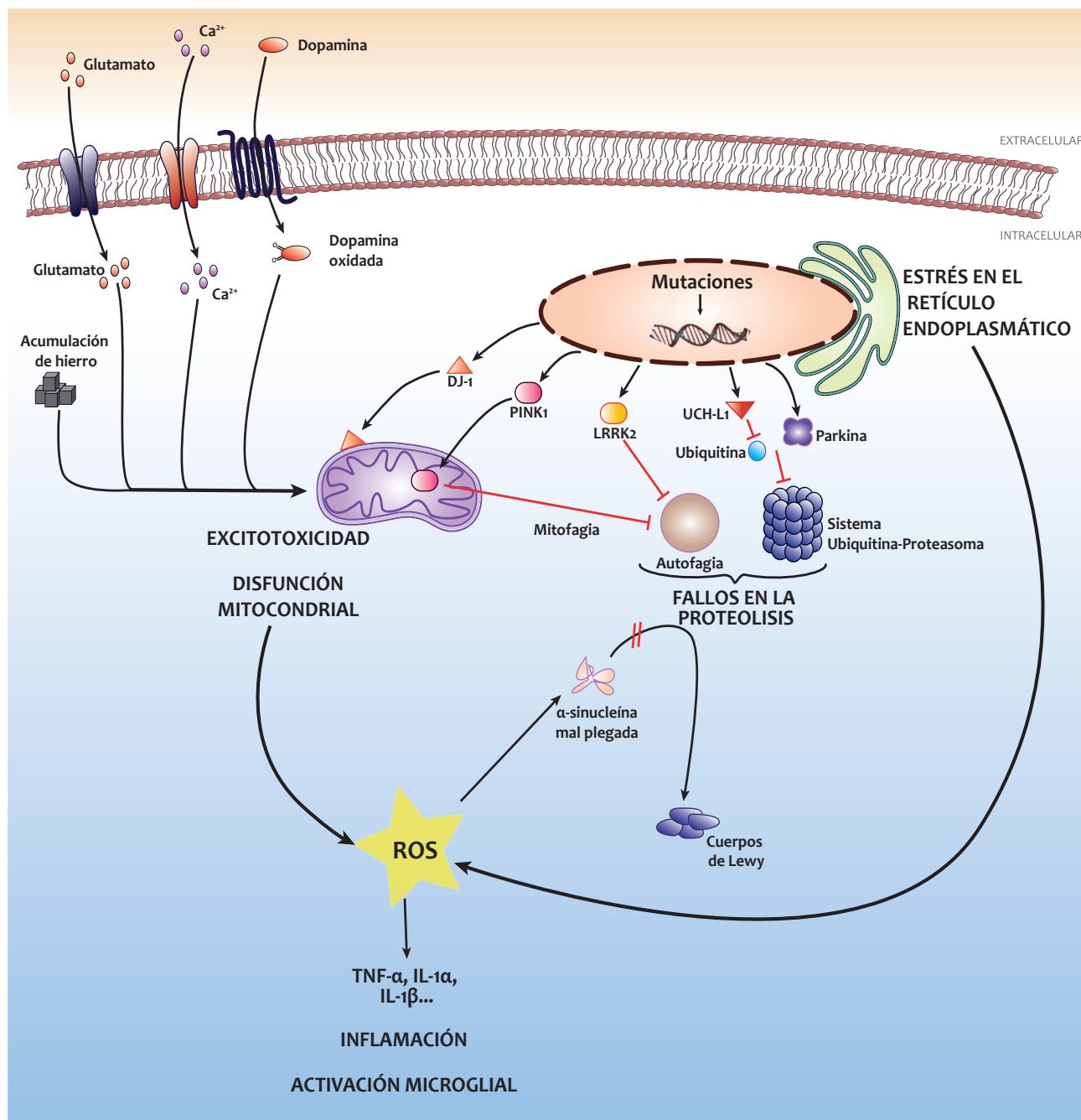


Figura 6. La muerte neuronal presente en la EP puede ser provocada por la acumulación de proteínas mal plegadas y mitocondrias defectuosas, debido a los fallos encontrados en los sistemas de proteólisis. Las mutaciones en UCH-L1 y parkina provocan un fallo en el sistema Ubiquitina-proteasoma, mientras que las mutaciones en LRRK2 y PINK1 provocan fallos en la autofagia y mitofagia, respectivamente. El estrés oxidativo generado por el metabolismo de la dopamina, la acumulación de Ca^{2+} y glutamato, los depósitos de hierro, la disfunción mitocondrial y del retículo endoplásmico producen especies reactivas de oxígeno (ROS) que a su vez provocan errores en el plegamiento de proteínas como α -sinucleína, que al no poder ser degradadas acaban acumulándose en los Cuerpos de Lewy. A su vez, estas ROS producen una respuesta inflamatoria y de activación microglial. Basado en las figuras de Vila y Przedborski (2004) y Obeso et al. (2010).

Alteración de la proteostasis

La presencia de diferentes proteínas agregadas en los cuerpos de Lewy condujo a la idea de que el catabolismo de las proteínas dañadas o mutadas podía estar interrumpido en la EP (Spillantini *et al.*, 1998, Giasson *et al.*, 2000), situando en el punto de mira al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), cuya implicación fue apoyada por el descubrimiento de las mutaciones en parkina y UCH-L1, que tienen función como ligasa proteína-ubiquitina y en el reciclado de ubiquitina. Además, se encontraron cambios en la actividad catalítica y en la expresión en la SNpc del proteasoma 26S (también afectado por la alteración de la función mitocondrial) que se asociaron con una alteración de la degradación de α -sinucleína (McNaught y Jenner, 2001, Tofaris *et al.*, 2001, McNaught *et al.*, 2002). La presencia de autofagosomas y proteínas relacionadas con la autofagia en los cuerpos de Lewy también dirigieron la atención hacia los lisosomas y la posibilidad de que la autofagia (macro-autofagia, micro-autofagia, y autofagia mediada por chaperonas) (Schapira y Jenner, 2011) estuviese interrumpida en la EP. De hecho, la expresión de las proteínas de membrana asociadas al lisosoma de tipo 2A (LAMP2A), que median la autofagia por chaperonas, y la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) se reducen en la SNpc en la enfermedad (Alvarez-Erviti *et al.*, 2010).

Inflamación y activación microglial

En estudios con muestras *post mortem* de pacientes con EP se ha encontrado microglía activada y astrocitosis en la SNpc (McGeer *et al.*, 1988). También se han encontrado alteraciones en las citoquinas interleuquina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) tanto en cerebro como en líquido cefalorraquídeo (Hirsch y Hunot, 2009). En esta microglía activada está presente la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; Hirsch *et al.*, 2003), fuente de NO, que a su vez puede reaccionar con el superóxido, tanto de origen glial como neuronal, para formar peroxinitrito, altamente reactivo, y que puede nitrar proteínas y otras biomoléculas, como la α -sinucleína que aparece nitrada en los cuerpos de Lewy (Giasson *et al.*, 2000). Además, la existencia de inflamación en el sistema periférico aumenta más aún el daño de la sustancia *nigra* y parece ser debido a una ruptura de la barrera hematoencefálica que estaría permitiendo que las citoquinas proinflamatorias periféricas

afecten al cerebro (Hernández-Romero *et al.*, 2012). Todas estas evidencias señalan el valor instrumental que tiene en la patogénesis de la EP la activación de las células gliales, hasta el punto que los niveles en suero de RANTES, una quimioquina producida por la microglía activada, que se sabe que están muy elevados en enfermos de Parkinson, se ha propuesto como biomarcador de la enfermedad (Rentzos *et al.*, 2007).

Excitotoxicidad

Tanto el cuerpo estriado (donde se localizan los terminales nigroestriales dopaminérgicos) como la SNpc (donde se encuentran los cuerpos celulares de estas neuronas) están sujetos a control glutamatérgico, por lo que una alteración en la homeostasis de este neurotransmisor puede ser parte del proceso patogénico en la EP. Se piensa que el principal origen de la excitotoxicidad en la EP es la hiperactividad del núcleo subtalámico (STN), que libera glutamato e inerva la SNpc y el segmento interno del globo pálido (Bevan *et al.*, 2002, Steigerwald *et al.*, 2008). Así, a medida que se produce la pérdida neuronal en la SNpc, aumenta la actividad glutamatérgica del STN, que amplifica la muerte celular y contribuye a la evolución de algunos de los síntomas clínicos de la EP, por ejemplo, el temblor parquinsoniano.

Terapias actuales

En la actualidad, la EP sigue siendo una enfermedad incurable y los tratamientos disponibles están enfocados a paliar los síntomas motores, pero no se dispone aún de una terapia que ralentice la progresión de la muerte neuronal o la detenga, y mucho menos que repare el daño ya producido cuando aparecen los síntomas, algo necesario teniendo en cuenta que cuando aparecen, la pérdida neuronal puede ser superior al 60%. A continuación se explican los medicamentos y terapias más utilizados:

Levodopa (L-DOPA)

El reemplazo dopaminérgico es el tratamiento de referencia contra la EP. Se administra L-DOPA en lugar de DA porque ésta es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez en el estriado, la L-DOPA es transformada en DA por las neuronas dopaminérgicas supervivientes, pero también existe síntesis extra-dopaminérgica por parte de neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas, e

incluso en la glía (De Deurwaerdere *et al.*, 2016). Se combina con inhibidores de la DOPA descarboxilasa periférica (carbidopa, benserazida), de la Catecol-O-Metil Transferasa (entacapona, tolcapona) y de la monoamino oxidasa B (rasagilina, selegilina) para aumentar la biodisponibilidad de DA y evitar la degradación de la L-DOPA antes de que llegue al cerebro y produzca efectos secundarios como náuseas (Connolly y Lang, 2014).

Agonistas de dopamina (apomorfina, bromocriptina, pramipexole, rotigotina)

Actúan estimulando directamente los receptores dopaminérgicos de las neuronas de proyección estriatal. Estos compuestos presentan diferentes afinidades por los receptores D₁/D₂, pero por norma general, parece que el beneficio se obtiene gracias a su acción sobre los D₂. No son tan efectivos como la L-DOPA, a excepción de la apomorfina, usada en casos súbitos de inmovilidad, que actúa rápidamente tras su inyección, pero con una duración de unos 30 minutos (Lewis *et al.*, 2006). Los agonistas pueden prescribirse como terapia inicial o como complemento de la L-DOPA en personas que desarrollan fluctuaciones en sus síntomas (Connolly y Lang, 2014). Los parches de rotigotina son útiles en pacientes que no pueden deglutir (Chen *et al.*, 2009).

Amantadina

Promueve la liberación de DA, bloquea su recaptación, inhibe el receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y tiene una ligera actividad anticolinérgica. En las etapas tempranas de la EP se puede usar contra el temblor, pero su importancia reside en que es el único tratamiento aprobado frente a la disquinesia provocada por L-DOPA (Hubsher *et al.*, 2012).

Estimulación cerebral profunda

Se realiza mediante la implantación de unos pequeños electrodos que aplican una corriente sobre el globo pálido interno, el tálamo y el núcleo subtalámico que permiten aliviar los temblores, rigidez y los problemas para caminar, entre otros (Ughratdar *et al.*, 2015).

Trasplantes intraestriatales de células productoras de DA

En 1985 se empezó a experimentar con implantes autólogos de células cromafines procedentes de la médula adrenal en el

núcleo caudado *putamen* (Backlund *et al.*, 1985, Madrazo *et al.*, 1987, Jiao *et al.*, 1988). Poco después también se empezó a implantar tejido mesencefálico fetal, capaz de liberar DA, sobrevivir a largo plazo y disminuir el temblor y rigidez (Henderson *et al.*, 1991, Hallett *et al.*, 2014), para más tarde realizar autotrasplantes de células del cuerpo carotídeo (Arjona *et al.*, 2003) y más actualmente, implantes de células madre y células reprogramadas procedentes de fibroblastos (Lindvall, 2016). Desafortunadamente, en algunos casos ha aparecido rechazo autoinmune, se han desarrollado tumores o un efecto secundario de causa desconocida llamado disquinesia inducida por injerto (Barker y Widner, 2004, Wijeyekoon y Barker, 2009, Steece-Collier *et al.*, 2012). Cuando se utilizan células reprogramadas del propio paciente vuelven a aparecer los agregados proteicos y si las células son sanas, se vuelven a reproducir esos problemas con la α -sinucleína por propagación priónica (Brundin *et al.*, 2008, Petit *et al.*, 2014), lo que ha limitado el uso de estas técnicas.

Disquinesia

Las disquinesias abarcan diferentes fenómenos hiperquinéticos, particularmente corea (movimientos rápidos, breves e irregulares), distonía (menor tono muscular), estereotipias (movimientos balanceantes del cuerpo), y acatisia (incapacidad para mantenerse quieto) (Walters *et al.*, 1990, Loonen y Ivanova, 2013). La disquinesia inducida por levodopa aparece en alrededor del 30% de los pacientes con EP que han sido tratados con L-DOPA durante mucho tiempo (Parkinson Study Group, 1996). Los mecanismos que la provocan no están bien definidos por el momento, aunque se piensa que puede estar inducida por una concentración de DA estriatal lo suficientemente alta como para activar los receptores de DA postsinápticos, y que la distonía puede aparecer cuando la concentración de DA es baja (Bezard *et al.*, 2001, Huot *et al.*, 2013).

La estrategia más utilizada para tratarlas suele ser el fraccionamiento de las dosis de L-DOPA, mientras que muchos pacientes requieren la estimulación profunda del cerebro para controlar sus fluctuaciones motoras (Vijayakumar y Jankovic, 2016).

También se investigan coadyuvantes que puedan ser administrados junto con la L-DOPA

para controlar sus efectos pro-disquinéticos, permitan reducir sus dosis o, en el mejor de los casos, sean capaces de sustituirla (Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2013, Lazzara *et al.*, 2015).

Investigación actual y líneas prioritarias

Buena parte de las investigaciones y los hallazgos encontrados en EP se realizan sobre tejido humano procedente de pacientes después de su fallecimiento, y cada vez más, sobre muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, linfocitos y fibroblastos donados en vida, por lo que el mantenimiento de los biobancos y las donaciones por parte de los pacientes de Parkinson y sus familiares son fundamentales para el estudio y comprensión de los mecanismos que se producen en la enfermedad y las causas que la provocan.

A medida que se avanza en los descubrimientos sobre la patología de la EP, se desarrollan nuevos modelos celulares y animales que buscan mimetizar los mecanismos causantes o acompañantes en la enfermedad (Meredith *et al.*, 2008). En cuanto a los modelos animales, un modelo experimental ideal de EP debería reproducir las características patológicas y clínicas de la enfermedad comprendiendo los sistemas dopaminérgicos y no dopaminérgicos, el sistema central y el periférico. Adicionalmente, debería ser dependiente de la edad para representar con fidelidad el transcurso de la enfermedad. Desafortunadamente, ningún modelo de EP reúne todas estas características (Dawson *et al.*, 2010). A pesar de estas limitaciones, los modelos animales nos sirven como herramienta para comprender los mecanismos de la enfermedad e investigar posibles dianas terapéuticas.

Los actuales modelos de EP se pueden dividir en dos grupos: genéticos y basados en neurotoxinas. Cada uno con sus ventajas e inconvenientes.

Modelos genéticos

Con el descubrimiento de genes implicados en el riesgo de sufrir EP, se crearon modelos genéticos para identificar cómo contribuyen determinados genes mutados a la patogénesis de la EP en humanos y estudiar su mecanismo de acción (Meredith *et al.*, 2008, Bezard y Przedborski, 2011). Así, se han desarrollado

líneas celulares y modelos animales, especialmente roedores, con mutaciones en las proteínas de interés, deleciones en esos genes o bien la introducción de transgenes humanos mutados en su organismo. Por ejemplo, α -sinucleína, *parkina*, *DJ-1*, *PINK1*, *UCH-L1* y *LRRK2*.

En la presente Tesis, se han utilizado los siguientes modelos genéticos de EP:

Pitx3^{-/-}

Polimorfismos en *Pitx3* se han asociado a la EP (Fuchs *et al.*, 2009). Los ratones *aphakia* son deficientes para la proteína PITX3, factor de transcripción implicado en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Hwang *et al.*, 2003), por lo que los ratones *Pitx3*^{-/-} presentan una depleción dopaminérgica bilateral y son una buena herramienta para el estudio de la disquinesia ya que reproducen los cambios bioquímicos esperados tras el tratamiento crónico con L-DOPA (Ding *et al.*, 2007) y es uno de los pocos modelos genéticos que desarrolla movimientos estereotipados tras la administración del fármaco (Shan *et al.*, 2015).

LRRK2-G2019S

Este modelo consiste en ratones transgénicos que sobreexpresan el gen *LRRK2* humano (*locus PARK8*) con la mutación G2019S (Ramonet *et al.*, 2011), que codifica la proteína quinasa con repeticiones ricas en leucina de tipo 2 (LRRK2), también llamada dardarina (se utilizó el término *dardara* que en euskera significa *temblor* debido a la elevada incidencia de EP familiar por mutaciones en LRRK2 en una determinada región del País Vasco; Paisán-Ruiz *et al.*, 2004) y es la causa más prevalente de parkinsonismo autosómico dominante de inicio tardío, aunque también aparecen alteraciones en LRRK2 en diferentes casos de parkinsonismo esporádico (Khan *et al.*, 2005).

Los ratones transgénicos expresan 3-5 veces más LRRK2 humana que propia, encontrándose los mayores niveles de ARNm en bulbo olfatorio, corteza, hipocampo, estriado y cerebelo y una clara expresión en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, por lo que este modelo parece *a priori* una buena herramienta para el estudio de la EP dado que presenta pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* a los 19-20 meses de edad y ciertos cambios comportamentales (Ramonet *et al.*, 2011).

El inconveniente metodológico de algunos modelos genéticos es que su empleo necesita de tiempos largos de experimentación ya que el inicio del fenotipo patológico es tardío y la progresión de la neurodegeneración es lenta, aunque refleja de forma bastante real la evolución de la enfermedad en los humanos (Dawson *et al.*, 2010). Los tiempos de experimentación se pueden acortar mediante el uso de modelos neurotóxicos, en los que se utilizan agentes que producen un daño en la ruta nigrostriatal de manera más rápida y evidente.

Modelos basados en neurotoxinas

En estos modelos se utilizan diferentes neurotoxinas (mitocondriales, excitotoxinas, prooxidantes o proinflamatorias) que atacan a una población celular específica (Jonsson, 1980).

En cultivos celulares, generalmente se utiliza la línea celular SH-SY5Y, que son células de neuroblastoma humano con características de neuronas dopaminérgicas. Expresan tirosina hidroxilasa (TH) y el transportador de DA, entre otros. Pueden ser dañadas con MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o con lactacistina, un inhibidor del proteasoma (Xie *et al.*, 2010, Dasgupta *et al.*, 2014, Sun *et al.*, 2016) entre otras posibles estrategias.

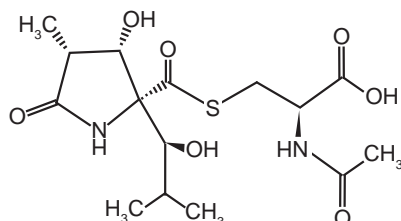


Figura 7. Estructura química de la lactacistina

En los modelos animales de EP se utilizan los inhibidores del complejo I mitocondrial MPTP, paraquat y rotenona, la molécula oxidante 6-OHDA, o la toxina inflamatoria lipopolisacárido (LPS)... para provocar una denervación del estriado de terminales dopaminérgicos y la muerte de las propias neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Jonsson, 1980).

MPTP

El modelo de MPTP surgió a principios de los años 80 a raíz de una intoxicación sufrida por varios drogadictos de California que habían consumido una partida del narcótico opioide meperidina, que estaba contaminada con MPTP (Langston *et al.*, 1983). Estas personas fueron

ingresadas con síntomas severos parecidos a los de la EP y fueron tratados con éxito con L-DOPA. El MPTP es lipofílico, puede cruzar la barrera hematoencefálica. En los astrocitos, es metabolizado por la monoamina oxidasa B y se convierte en el catión tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), después es liberado al espacio extracelular (Rappold y Tieu, 2010), donde es captado por las neuronas dopaminérgicas y terminales vecinos a través del transportador de DA. Una vez acumulado en las neuronas dopaminérgicas, el MPP⁺ induce neurotoxicidad principalmente mediante la inhibición de complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que resulta en una depleción de ATP y aumento del estrés oxidativo (Mizuno *et al.*, 1987). Se han encontrado cuerpos de Lewy en monos tratados con MPTP (Forno *et al.*, 1986), pero no en los ratones. Hasta la fecha, el modelo de lesión con MPTP en primates sigue siendo el que mejor reproduce la patología de la enfermedad, no solo por la toxina utilizada, sino también por el uso de una especie animal más cercana evolutivamente al ser humano.

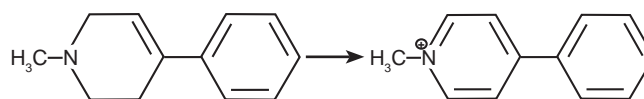


Figura 8. Transformación del MPTP en MPP⁺

6-OHDA

El análogo hidroxilado de la DA, la 6-hidroxidopamina, puede inducir degeneración tanto en las neuronas dopaminérgicas como en las noradrenérgicas (Ungerstedt, 1968) debido a que los transportadores tanto de DA como de noradrenalina, tienen gran afinidad por esta molécula (Luthman *et al.*, 1989). Una vez dentro de las neuronas, la 6-OHDA se acumula en el citosol donde es rápidamente oxidada liberando especies reactivas de oxígeno (ROS) y produciendo citotoxicidad por estrés oxidativo (Blum *et al.*, 2001). Este modelo no presenta formación de agregados por cuerpos de Lewy.

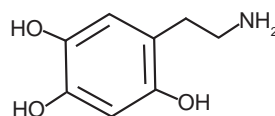


Figura 9. Estructura química de la 6-OHDA

Para alcanzar neuronas específicas, y dado que la 6-OHDA no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, ésta se inyecta

de manera estereotáxica dentro de la región cerebral de interés o, en ocasiones, por vía intracerebroventricular (i.c.v.; Rodríguez Díaz *et al.*, 2001).

LPS

El modelo de lesión con lipopolisacárido (LPS) se ha estudiado menos y se basa en provocar una respuesta neuroinflamatoria similar a la que se produce en la EP como inductora de la muerte celular (Przedborski, 2007, Hirsch y Hunot, 2009). Aunque la 6-OHDA y el MPTP también pueden provocar una respuesta inflamatoria, ésta es de mucha menor intensidad y, sobre todo, no es la causante principal de la muerte neuronal, sino más bien una consecuencia que perpetúa el círculo vicioso de la neurotoxicidad. En el modelo de LPS la causa de la muerte neuronal es la propia neuroinflamación.

El LPS es una endotoxina de las bacterias gram-negativas que activa la microglía a través del receptor toll-like 4 y desencadena la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias. Puede ser inyectado estereotáxicamente en la sustancia *nigra*, tracto prosencefálico medial (m.f.b.) o directamente en el estriado. Cuando se inyecta en la *nigra*, produce activación microglial y pérdida sostenida de neuronas dopaminérgicas a las 24 horas (Iravani *et al.*, 2005), junto con una reducción sostenida de la concentración de DA de aproximadamente un 60% (Herrera *et al.*, 2000). Cuando se inyecta en el estriado, la pérdida de neuronas dopaminérgicas es más paulatina (Hunter *et al.*, 2009).

En la presente Tesis utilizaremos los modelos de lesión por 6-OHDA y LPS.

Cannabinoides y Sistema Endocannabinoide

Desde la antigüedad, y sobre todo en las culturas orientales, se han utilizado preparaciones de la planta *Cannabis sativa* con fines terapéuticos o formando parte de rituales de carácter religioso o social. Hoy en día, aunque los preparados obtenidos a partir de la planta, como el *hachís* o la *marihuana*, son ilegales en la mayoría de países occidentales, estos tienen una elevada prevalencia de uso y se encuentran entre las drogas de abuso más consumidas del mundo (Mechoulam *et al.*, 2014).

Cannabis sativa y fitocannabinoides

Aunque no existe mucho consenso en cuanto a la taxonomía de la planta *Cannabis*, lo más aceptado es que se divide en tres especies; *sativa*, *indica* y *ruderalis* (Hillig, 2005). Siendo la *Cannabis sativa* la más estudiada y la principal portadora de cannabinoides con propiedades psicotrópicas (Hillig y Mahlberg, 2004).

Cannabis sativa contiene más de 500 compuestos químicos diferentes, de los cuales, 104 forman parte de la llamada familia de los cannabinoides y se les denomina fitocannabinoides. Estos compuestos proceden del metabolismo secundario de la planta y se concentran principalmente en los tricomas de la planta femenina (Fisar, 2009, Gould, 2015). Se les supone una función antimicrobiana y pigmentaria, proporcionando olor y sabor para ahuyentar a los depredadores y como defensa contra la deshidratación (Solorzano-Santos y Miranda-Novales, 2012). Desde el punto de vista

químico, los cannabinoides son terpenoides (Aizpurua-Olaizola *et al.*, 2014).

En los años 40 se aislaron los primeros fitocannabinoides, el cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN; Adams, Baker *et al.* 1940; Adams, Hunt *et al.* 1940), pero estos compuestos no son los responsables de los efectos psicoactivos, de manera que el hito importante en el estudio de la farmacología de los cannabinoides llegó dos décadas después, cuando Mechoulam y Gaoni (1965) identificaron y aislaron la estructura del principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*, el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC).

Los investigadores, en la búsqueda de un mecanismo que explicase por qué los cannabinoides son capaces de provocar esos efectos psicotrópicos en los humanos (O'Shaughnessy, 1841), pensaron inicialmente que los cannabinoides ejercían su acción farmacológica a través de interacciones no

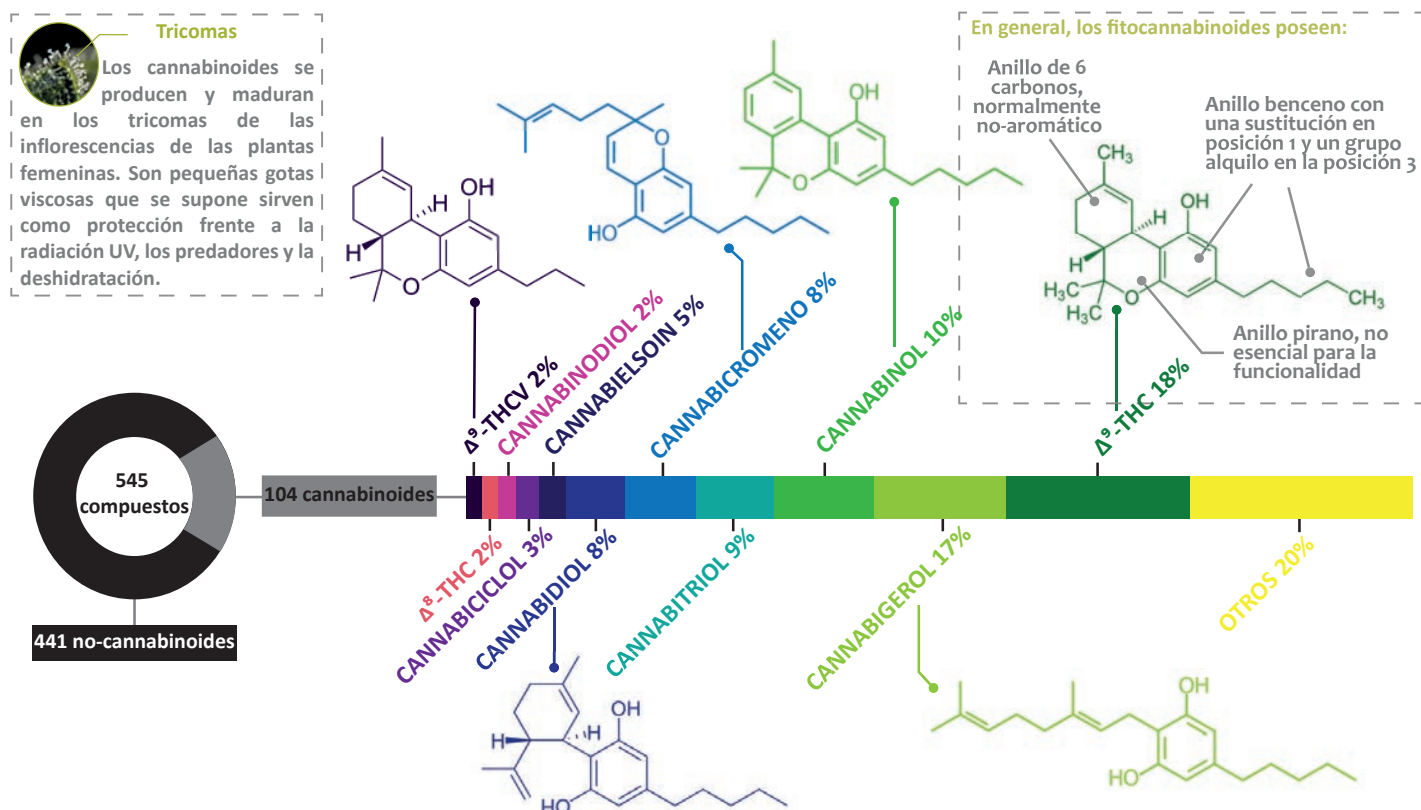


Figura 10. Clasificación de las moléculas presentes en la planta *Cannabis sativa* y proporción de fitocannabinoides con sus estructuras químicas más representativas. Basado en la figura de Gould (2015).

específicas con la membrana celular, debido a su naturaleza lipofílica (Mechoulam *et al.*, 1980, Mechoulam *et al.*, 1988). Sin embargo, estudios detallados de relación estructura-actividad sugirieron un mecanismo específico, mediado por receptor, como el responsable de su actividad, ya que la modificación estructural de las moléculas cannabinoides provoca importantes cambios en su actividad biológica (Dewey, 1986, Hollister, 1986, Howlett *et al.*, 1988). Se empezaba a vislumbrar la existencia de un sistema específico en mamíferos cuando a finales de los años 80 se aisló un receptor de membrana sobre el actuaban los cannabinoides (Howlett *et al.*, 1988). Fue el posteriormente llamado *receptor cannabinoide de tipo 1* (CB₁; Devane *et al.*, 1988) y pocos años después, en los años 90, se encontró un segundo receptor que se denominó *receptor cannabinoide de tipo 2* (CB₂; Munro *et al.*, 1993). Después de estas dos fechas clave, y hasta casi el presente, se han ido identificando otros receptores sobre los que actúan los cannabinoides (algunos agonistas de nueva identificación como el Abnormal-CBD), procedentes de la lista de receptores huérfanos (GPR55 y GPR18), o procedentes de sistemas ya identificados (TRPV1 y PPARs), aunque finalmente no ha habido consenso para renombrar a ninguno de ellos como el *receptor*

cannabinoide de tipo 3 (Pertwee *et al.*, 2010, Gasperi *et al.*, 2013).

Tras el hallazgo de los primeros receptores cannabinoides, los investigadores empezaron a pensar en la existencia de algún ligando endógeno que actuara sobre ellos a semejanza de lo ocurrido con la morfina y el sistema opioide endógeno, y de esta forma se describieron diferentes endocannabinoides, todos ellos de naturaleza lipídica (derivados de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente del ácido araquidónico) (Di Marzo, 2008), entre los cuales, los más importantes son la araquidonoil etanolamida (anandamida o AEA) (Devane *et al.*, 1992) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG; Mechoulam *et al.*, 1995). A partir del descubrimiento de estos ligandos endógenos y en subsiguientes estudios, se ha podido demostrar que los receptores cannabinoides y los endocannabinoides funcionan como un sistema de comunicación intercelular con funciones moduladoras de procesos centrales y periféricos, al que se ha denominado Sistema Cannabinoide Endógeno o Sistema Endocannabinoide, en el que también están incluidos los sistemas enzimáticos de síntesis y degradación de endocannabinoides (Cravatt y Lichtman, 2004).

Sistema Endocannabinoide

Como se ha dicho antes, se trata de un sistema de comunicación intercelular involucrado en el mantenimiento de la homeostasis celular tanto a nivel central como periférico.

Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los GPCR son receptores con 7 dominios transmembrana que integran diferentes estímulos extracelulares en vías de señalización intracelular mediante la interacción con proteínas G.

Receptor CB₁

El primero en descubrirse fue el receptor CB₁, consta de 472 aminoácidos (Gerard *et al.*, 1991) codificado por el gen *CNR1* y su actividad está relacionada, entre otros, con los efectos psicotrópicos de los cannabinoides (Ledent *et al.*, 1999). Su secuencia está altamente conservada a través de la evolución y se ha encontrado en mamíferos, reptiles, aves, peces y algunos invertebrados (Sayers *et al.*, 2009). Está ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC), en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y precursores neurales (Sánchez *et al.*, 1998, Sánchez *et al.*, 2001, Molina-Holgado *et al.*, 2002, Aguado *et al.*, 2005). En las neuronas, se localiza principalmente a nivel de los terminales presinápticos (Szabo y Schlicker, 2005) aunque de forma reciente también se ha observado su presencia en la membrana mitocondrial externa de neuronas, donde podría modular la respiración mitocondrial y, por lo tanto, la disponibilidad de energía en las neuronas, y la homeostasis del calcio (Benard *et al.*, 2012). Las regiones cerebrales con mayor nivel de expresión son los ganglios basales (sustancia *nigra*, globo pálido y estriado), cerebelo e hipocampo, y en menor medida áreas corticales. Fuera del SNC, se ha encontrado al receptor CB₁ en las glándulas suprarrenal y pituitaria, corazón, hígado, bazo, tracto gastrointestinal y sistemas urinario y reproductor (Gerard *et al.*, 1991, Galiegue *et al.*, 1995, Mackie, 2005).

Receptor CB₂

El segundo receptor cannabinoide en identificarse fue el receptor CB₂, que inicialmente se encontró en bazo, por lo que históricamente se le han atribuido funciones

en el sistema inmunitario y localización principalmente periférica. El receptor CB₂ consta de 360 aminoácidos codificados en el gen *CNR2* (Karsak *et al.*, 2005). Presenta una homología del 44% respecto al receptor CB₁, que llega a ser del 68% en las regiones transmembrana. La homología entre especies es variable, siendo solo del 81% entre rata y humano (Matsuda, 1997, Begg *et al.*, 2005). Se ha encontrado al receptor CB₂ principalmente en células del sistema inmune como macrófagos, células NK, linfocitos T y B, monocitos y neutrófilos (Derocq *et al.*, 1995, Galiegue *et al.*, 1995). También se ha descrito su presencia en tejidos periféricos que no pertenecen al sistema inmune, como endotelio pulmonar (Zoratti *et al.*, 2003), tracto gastrointestinal (Storr *et al.*, 2002), corazón (Joyeux *et al.*, 2002), adipocitos (Roche *et al.*, 2006), y también en células como osteoblastos y osteoclastos (Ofek *et al.*, 2006) y células meióticas (Grimaldi *et al.*, 2009). También se expresa en el hígado cirrótico pero no en el sano (Julien *et al.*, 2005). Aunque la presencia del receptor CB₂ en el SNC ha estado rodeada de controversia, en los últimos años varios autores han encontrado su expresión en astrocitos y microglía, especialmente cuando se produce un cambio de fenotipo como respuesta a un daño de origen inflamatorio, infeccioso, traumático o tóxico (Carlisle *et al.*, 2002, Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Benito *et al.*, 2008), en algunas subpoblaciones neuronales del tronco cerebral (Van Sickle *et al.*, 2005), cerebelo (Gong *et al.*, 2006, Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014) y ganglios basales (Lanciego *et al.*, 2011), y en precursores neurales (Palazuelos *et al.*, 2006).

Otros receptores con actividad en el Sistema Endocannabinoide

Algunos efectos fisiológicos y farmacológicos de los cannabinoides no pueden ser explicados completamente a través de la activación o bloqueo de los receptores CB₁ y CB₂, lo que ha llevado a investigar otros posibles receptores que medien la acción de los cannabinoides en determinadas circunstancias. Por ejemplo, varios experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que algunos cannabinoides pueden unirse a otros GPCRs, a receptores nucleares e incluso a canales iónicos.

GPCRs

Algunos GPCRs huérfanos como GPR55, GPR119 o GPR18 se expresan de forma abundante en el SNC y son activados

por derivados de ácidos grasos y ciertos cannabinoides (McHugh *et al.*, 2012, Syed *et al.*, 2012, Sylantyev *et al.*, 2013). GPR55 es uno de los candidatos a *receptor cannabinoide de tipo 3* o CB₃, ya que *in vitro* puede ser activado por varios cannabinoides clásicos como Δ⁹-THC y HU-210 (Ross, 2009, Sharir y Abood, 2010), aunque otros investigadores no son partidarios de su clasificación como receptor cannabinoide, ya que su actividad *in vivo* en relación a los cannabinoides está por demostrar y su secuencia muestra una baja homología con las de los receptores CB₁ (13%) y CB₂ (14%) (Pruitt *et al.*, 2007). También presenta importantes diferencias en estructura, señalización y farmacología respecto a los receptores CB₁ y CB₂ (Shore y Reggio, 2015).

PPARs

Los receptores PPAR son receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas que al activarse, forman heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y actúan como factores de transcripción de genes involucrados en la regulación del metabolismo lipídico, diferenciación celular e inflamación (Ferre, 2004, Moraes *et al.*, 2006, Stienstra *et al.*, 2007). Se dividen en tres isoformas; α, β y γ (Mandrekar-Colucci *et al.*, 2013), y se expresan tanto en neuronas como en células gliales (oligodendrocitos, astrocitos y microglía) (Cristiano *et al.*, 2001, Moreno *et al.*, 2004). Cuando son activados, por compuestos de la familia de las glitazonas, por ejemplo, han demostrado en modelos animales que atenúan la patología asociada a enfermedades causadas por neuroinflamación crónica (Odegaard *et al.*, 2008, Bouhrel *et al.*, 2009, Chawla, 2010), por lo que los agonistas de las tres isoformas parecen poseer potencial terapéutico en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas mediante la reducción de la inflamación (Villapol *et al.*, 2012), y posiblemente confiriendo neuroprotección por su habilidad de reducir la disfunción mitocondrial (Fuenzalida *et al.*, 2007) y su capacidad como lavadores de ROS (Aleshin y Reiser, 2013). Además, la activación de PPARγ colabora al crecimiento axonal (Miglio *et al.*, 2009) y parece poseer efectos analgésicos (Churi *et al.*, 2008). Ciertos cannabinoides, como la AEA, pueden activar a PPARα y el Δ⁹-THC y WIN55,212,2 pueden activar a PPARγ y desencadenar una respuesta antiinflamatoria (Mestre *et al.*, 2009, O'Sullivan y Kendall, 2010).

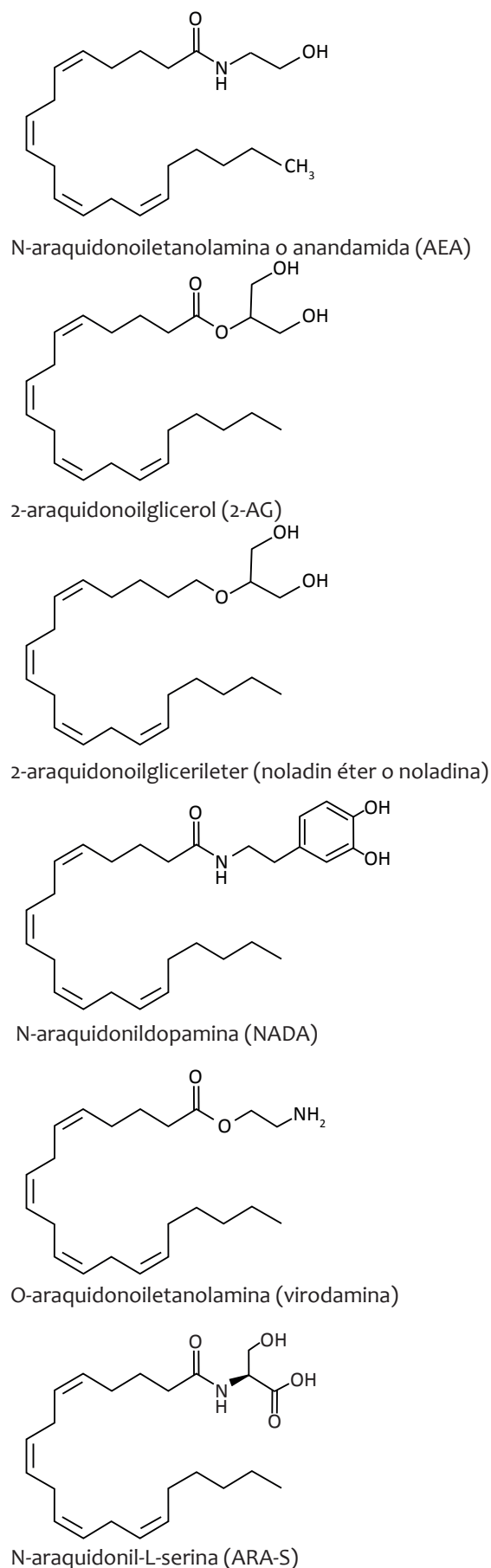


Figura 11. Estructuras de los principales endocannabinoides.

TRPs

Por último, los cannabinoides también pueden unirse a algunos TRPs, una extensa familia de canales catiónicos membranales que regulan señales sensoriales (De Petrocellis *et al.*, 2011). Los TRPs activados por cannabinoides se dividen en dos subgrupos: receptores vanilloides (TRPVs) responsables de la respuesta a sensaciones de dolor/calor y que también se activan por capsaicina, y receptores de anquirina (TRPAs) encargados de la respuesta a la presión. La AEA y el agonista selectivo CB₁, araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA) pueden mimetizar la acción de la capsaicina sobre los canales TRPV1 (Di Marzo *et al.*, 1998, Zygmunt *et al.*, 1999, Price *et al.*, 2004), CBD y Δ⁹-THC pueden activar los TRPV2 (Qin *et al.*, 2008), mientras que Δ⁹-THC y CBN pueden activar los TRPA1 (Jordt *et al.*, 2004).

Endocannabinoides

Los ligandos de los receptores del sistema cannabinoide endógeno o endocannabinoides son moléculas derivadas del ácido araquidónico (y otros ácidos grasos poliinsaturados) que también es precursor de la síntesis de prostaglandinas y mediador de procesos inflamatorios. Normalmente están poliinsaturados y forman un enlace amida, éster o éter con un grupo polar pequeño. No se almacenan en vesículas sino que se sintetizan *a demanda* cuando y donde son necesarios. Los más representativos son la *N*-araquidonoiletanolamina o AEA (Devane *et al.*, 1992), el 2-araquidonoilglicerol (2-AG; Mechoulam *et al.*, 1995), el 2-araquidonoilglicerileter (noladin éter; Hanus *et al.*, 2001), el antagonista endógeno *O*-araquidonoiletanolamina (virodamina; Porter *et al.*, 2002), la *N*-araquidonildopamina (NADA; Huang *et al.*, 2002) y más recientemente la *N*-araquidonilserina (ARA-S; Guo *et al.*, 2008) y la *N*-araquidonilglicina (McHugh *et al.*, 2012). Aunque algunos de estos compuestos, como NADA, son considerados endovanilloides más que endocannabinoides (Starowicz *et al.*, 2007).

En cuanto a su metabolismo, los procesos por los que se sintetizan, liberan y degradan la AEA y el 2-AG son los más estudiados hasta el momento, aunque parece que para los demás endocannabinoides descritos, los procesos pueden ser similares (Fezza *et al.*, 2002).

La AEA fue el primer endocannabinoide descubierto por Devane *et al.* (1992) y recibió

su nombre del sánscrito *ananda*, que significa *felicidad suprema* y de su estructura tipo amida. Actúa como agonista parcial CB₁ y agonista débil de los receptores CB₂, aunque parte de su baja actividad a nivel de receptor se debe a su reducida estabilidad metabólica (Felder y Glass, 1998, Pertwee, 1999).

Los niveles de AEA en el SNC son bastante más bajos que los de otros endocannabinoides y parece estar presente principalmente en regiones ricas en receptores CB₁, como el hipocampo, corteza cerebral y estriado, aunque en otras áreas que presentan pocos receptores CB₁, como el tallo cerebral o el tálamo se ha descrito una elevada concentración de AEA y sin embargo en el cerebelo, con abundante presencia CB₁, los niveles de AEA son bajos (Felder *et al.*, 1996, Bisogno *et al.*, 1999, Yang *et al.*, 1999). A nivel periférico, está presente en bazo, corazón y piel (Felder y Glass, 1998).

El 2-AG fue el segundo endocannabinoide encontrado (Mechoulam *et al.* 1995), y para algunos investigadores es más importante que la AEA a nivel fisiológico por ser tres o más órdenes de magnitud más abundante en el cerebro (Sugiura *et al.*, 1995). Su distribución presenta las máximas concentraciones en tronco cerebral, estriado e hipocampo, y las más bajas en corteza cerebral, diencefalo y cerebelo (Bisogno *et al.*, 1999). En tejidos periféricos, predomina en intestino, bazo y páncreas (Mechoulam *et al.*, 1995), corazón, hígado y riñón (Kondo *et al.*, 1998). Actúa como agonista tanto del receptor CB₁ como del receptor CB₂ (Gonsiorek *et al.*, 2000, Pertwee y Ross, 2002).

Síntesis de endocannabinoides

Tanto AEA como 2-AG se sintetizan principalmente como respuesta a un aumento intracelular de Ca²⁺, pero por mecanismos independientes.

En el caso de la AEA, la entrada de Ca²⁺ al interior de la célula activa una *N*-aciltransferasa que provoca la acilación de una fosfatidiletanolamina presente en la membrana con ácido araquidónico para formar *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta NAPE es hidrolizada por una fosfolipasa D específica para este precursor (NAPE-PLD), también dependiente de Ca²⁺, produciendo ácido fosfatídico y AEA (Di Marzo *et al.*, 1994, Di Marzo, 2008). Como se puede ver en la Figura 12, existen otras vías de formación de AEA independientes de NAPE-PLD en

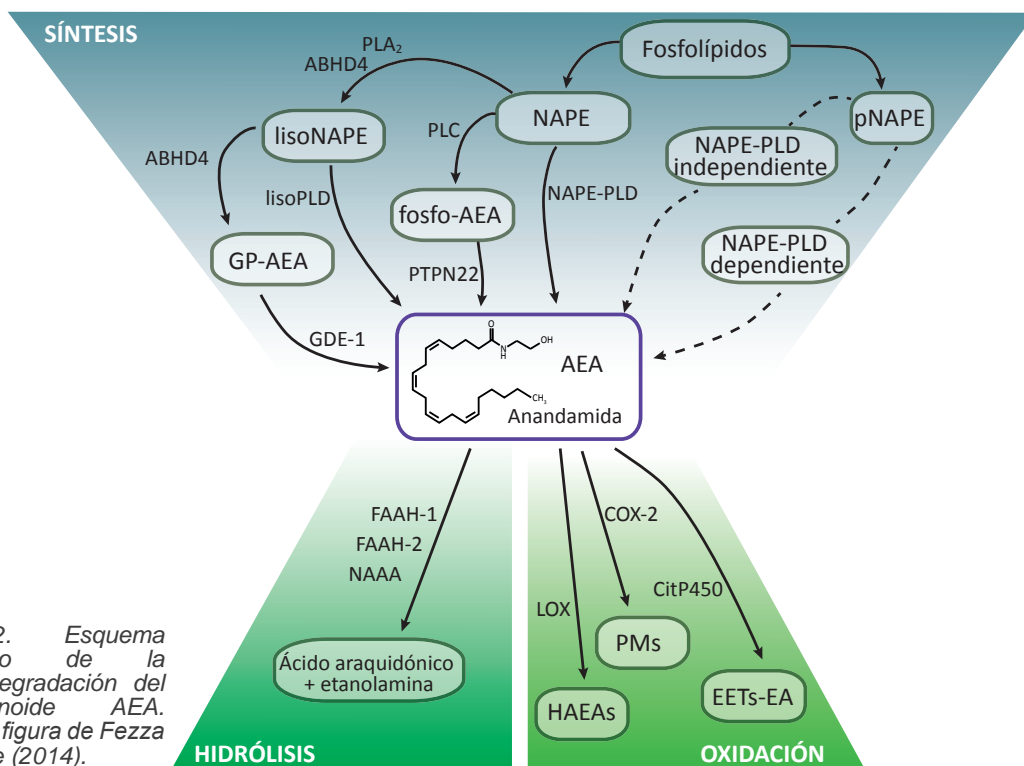


Figura 12. Esquema representativo de la síntesis y degradación del endocannabinoide AEA. Basado en la figura de Fezza y Maccarrone (2014).

las que participan otras enzimas capaces de transformar la NAPE en AEA (Di Marzo, 2011) mediante la formación de intermediarios como la fosfo-AEA por la fosfolipasa C (PLC), posteriormente transformada por la tirosina fosfatasa PTPN22 (Liu *et al.*, 2006), la lisoNAPE por fosfolipasa A₂ (PLA₂) o ABHD4 y posteriormente transformada por la lisoPLD (Sun *et al.*, 2004), o la glicerofosfo-AEA formada a partir de lisoNAPE por la ABHD4 y transformada en AEA por GDE-1 (Simon y Cravatt, 2010).

En el caso del 2-AG, la entrada de Ca²⁺ activa la PLC, que hidroliza el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) presente en la membrana celular, generando diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato. La acción de una diacilglicerol lipasa (DAGL) sobre el DAG produce finalmente 2-AG liberando el ácido graso que esterifica el carbono C1 del glicerol (Bisogno *et al.*, 2005, Basavarajappa, 2007). Como se puede ver en la Figura 13, el 2-AG también puede sintetizarse a partir de ácido fosfatídico (PA), reacción catalizada por la PA-fosfohidrolasa (Carrier *et al.*, 2004) o mediante la generación del intermedio 2-AG-trifosfato por la PLA₁ y posterior transformación por PLC (Nakane *et al.*, 2002).

Una vez sintetizados, los endocannabinoides son liberados al espacio extracelular, de forma que gracias a su acción de corto

alcance (paracrina), van a ser capaces de actuar sobre receptores localizados en las células cercanas y sobre la propia célula que los sintetiza. La duración de su acción viene determinada por la puesta en marcha de los procesos de inactivación de los endocannabinoides, que implican dos procesos; el transporte desde el espacio intercelular hacia el interior de las células (recaptación) y de su posterior hidrólisis por enzimas específicas (Bisogno *et al.*, 2005).

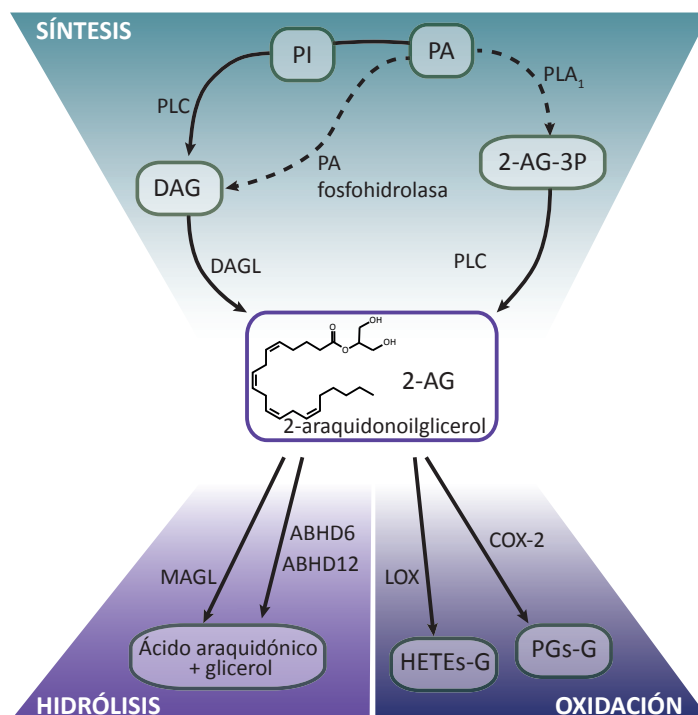


Figura 13. Esquema representativo de la síntesis y degradación del endocannabinoide 2-AG. Basado en la figura de Fezza y Maccarrone (2014).

Transporte al interior de la célula

Debido a la naturaleza lipofílica de los endocannabinoides se podría pensar que su transporte al interior de la célula se da por difusión simple como hacen los ácidos grasos de cadena larga. Su degradación en el interior de la célula sería suficiente para establecer un gradiente químico, que facilitara la direccionalidad de la difusión (Glaser *et al.*, 2003). También podría ser mediante endocitosis tras su concentración en balsas lipídicas ricas en caveolina (McFarland *et al.*, 2004, Dainese *et al.*, 2007). Sin embargo, teniendo en cuenta que el proceso parece ser saturable, competitivo, dependiente de la temperatura e independiente de iones sodio y de adenosin trifosfato (ATP), así como susceptible de ser inhibido de forma específica (Beltramo *et al.*, 1997, Hillard *et al.*, 1997) se ha propuesto la existencia de una proteína transportadora (AMT), aunque esta proteína todavía no ha podido ser aislada ni clonada. También se ha postulado que los endocannabinoides se transportan al interior celular mediante las proteínas que unen ácidos grasos FABP5 y FABP7 (Kaczocha *et al.*, 2009) o que se realiza por una variante truncada de la enzima hidrolasa de ácidos grasos, denominada FAAH-1 (Fu *et al.*, 2012).

Degradación

Una vez dentro de la célula, los endocannabinoides son degradados a través de una o varias reacciones enzimáticas, produciéndose así su inactivación o la formación de otros precursores bioactivos.

La AEA es degradada por la amidohidrolasa específica de ácidos grasos (FAAH; Cravatt *et al.*, 1996), generalmente asociada a elementos del citoesqueleto (McKinney y Cravatt, 2003). En el cerebro está ampliamente distribuida y es abundante en corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, médula espinal, tronco encefálico y cerebelo (Thomas *et al.*, 1997, Kano *et al.*, 2009). Su localización es postsináptica en neuronas de gran tamaño (células piramidales y células de Purkinje) y en células de glía, específicamente en astrocitos (Tsou *et al.*, 1998, Romero *et al.*, 2002). FAAH presenta otras dos isoformas denominadas FAAH-1, que predomina en SNC, y FAAH-2, que es predominante en periferia (Wei *et al.*, 2006). Como se puede ver en la Figura 12, la AEA también puede ser hidrolizada por la amidohidrolasa ácida de

N-aciletanolamina (NAAA) presente en periferia (Ueda *et al.*, 2011).

Aunque el 2-AG también puede ser hidrolizado por la FAAH (Goparaju *et al.*, 1998), éste parece ser un mecanismo menos frecuente, siendo la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL) la realmente responsable de su degradación (Dinh *et al.*, 2002). En el cerebro, esta enzima se localiza de manera presináptica en las regiones donde el receptor CB₁ está también presente, como hipocampo, corteza cerebral, tálamo y cerebelo (Dinh *et al.*, 2002). También se han descrito otras dos enzimas que hidrolizan el 2-AG, las hidrolasas ABHD6 y ABHD12, en otras localizaciones subcelulares (Blankman *et al.*, 2007).

Tanto la AEA como el 2-AG pueden ser oxidados por otras enzimas que participan en el metabolismo lipídico, como ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y enzimas del complejo P450 (Guindon y Hohmann, 2008, Yates y Barker, 2009, Snider *et al.*, 2010, Urquhart *et al.*, 2015, Zelasko *et al.*, 2015), generando gran cantidad de moléculas activas sobre otras dianas moleculares. Por ejemplo, la COX-2 puede utilizar AEA o 2-AG junto con ácido araquidónico y generar prostamidas y prostaglandinglicerol ésteres, respectivamente. A través de 12-LOX y 15-LOX, la AEA puede producir metabolitos que podrían activar a los receptores vanilloides (Pertwee y Ross, 2002) y el 2-AG, metabolitos que se unen a receptores nucleares como PPAR α (Moody *et al.*, 2001, Kozak *et al.*, 2002). Por otro lado, las enzimas dependientes del citocromo P450 generan epóxidos (ácido epoxieicosatetraenoico; EET) a partir de AEA (Zelasko *et al.*, 2015). Estos derivados oxigenados están directamente relacionados con procesos de respuesta a inflamación, tono vascular, inmunidad o angiogénesis, entre otros. Y explicarían algunos efectos paradójicos obtenidos cuando la degradación de endocannabinoides es inhibida (Valdeolivas *et al.*, 2013), ya que los endocannabinoides podrían estar actuando sobre vías independientes de los receptores CB₁ y CB₂.

Otros ligandos endógenos

Por último, se han descrito una serie de lípidos bioactivos derivados de ácidos grasos con una actividad biológica similar a la de los endocannabinoides clásicos

mencionados. Entre ellos, destacan las *N*-aciletanolaminas (*N*-oleiletanolamina, OEA; *N*-palmitoiletanolamina, PEA; *N*-linoleiletanolamina, LEA; *N*-estearoiletanolamina, SEA), con una estructura relacionada con la AEA cambiando el ácido graso. Sus efectos no pueden atribuirse a la activación de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, ya que, en general, tienen una baja afinidad por ellos (Conti *et al.*, 2002, Maccarrone *et al.*, 2002, Syed *et al.*, 2012). Estos lípidos modificarían la acción de los endocannabinoides incrementando su acción biológica debido a que comparten con la AEA las vías de síntesis y, sobre todo, de degradación, siendo sustratos de la enzima FAAH. De esta forma, estarían compitiendo con la AEA en su degradación, haciendo así más prolongados sus efectos, esto es lo que se denominó efecto *entourage* (Lambert y Di Marzo, 1999, Fowler *et al.*, 2003). Por otro lado, la OEA también puede mediar sus efectos a través de los receptores GPR119 (Overton *et al.*, 2006), TRPV1 (Ahern, 2003, González-Aparicio y Moratalla, 2014) o PPAR α (Fu *et al.*, 2003, Guzmán *et al.*, 2004). La PEA es capaz de ejercer su acción a través de la activación del receptor PPAR α (Lo Verme *et al.*, 2005, Citraro *et al.*, 2013).

También se han descrito varios monoacilglicerol de ácidos grasos diferentes del araquidónico, como el 2-oleilglicerol (2-OG), que presentan actividad cannabinoide a través de la activación del receptor GPR119 (Hansen *et al.*, 2011, Syed *et al.*, 2012).

Farmacología del Sistema Endocannabinoide

Existen moléculas, naturales o sintéticas, capaces de actuar sobre el Sistema Endocannabinoide, modificando su actividad. El estudio de sus estructuras químicas y mecanismos de acción, ha permitido la síntesis de nuevas moléculas cada vez más selectivas. En general, se pueden clasificar en agonistas y antagonistas/agonistas inversos de los receptores cannabinoides, y moduladores del *tono endocannabinoide* mediante regulación alostérica o inhibición de las enzimas de síntesis o degradación de endocannabinoides.

Agonistas de los receptores cannabinoides

Los agonistas de receptores cannabinoides

son moléculas capaces de unirse y activar al receptor CB₁, al receptor CB₂, o a ambos, con diferentes afinidades y potencia. Se clasifican respecto a su estructura en cuatro grupos: cannabinoides clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles y eicosanoides (Howlett *et al.*, 2002).

Cannabinoides clásicos

Los cannabinoides clásicos son compuestos derivados del dibenzopirano con diferentes cadenas laterales y grados de insaturación. Los fitocannabinoides con capacidad agonista presentes en la planta *Cannabis sativa* pertenecen a este grupo, como el Δ^9 -THC o el CBN, con capacidad de unión tanto a CB₁ como a CB₂, o compuestos no-psicoactivos como el CBG y el CBD (Mahadevan *et al.*, 2000, Pertwee, 2008, Izzo *et al.*, 2012).

Dentro de los cannabinoides clásicos presentes en la planta *Cannabis sativa*, el segundo más abundante es el CBD (Mechoulam y Shvo, 1963). El CBD no es psicoactivo debido a que posee una afinidad despreciable por los receptores CB₁ y CB₂, aunque se ha visto que *in vitro* es capaz de bloquear tanto a CB₁ como a CB₂ (Thomas *et al.*, 2007) e incluso de inhibir la recaptación de AEA (Bisogno *et al.*, 2001). Sin embargo, hoy por hoy está más aceptado que los efectos del CBD se deben a su estructura antioxidante y su interacción con receptores externos al Sistema Endocannabinoide como el receptor de serotonina 5HT_{1A} (Espejo-Porras *et al.*, 2013), el receptor PPAR γ (Esposito *et al.*, 2011) o el receptor de adenosina A₂ (Mecha *et al.*, 2013). También sobre diferentes canales iónicos y transportadores de neurotransmisores (Fernández-Ruiz *et al.*, 2013).

Otro fitocannabinoide perteneciente a este grupo, interesante por su farmacología, es el Δ^9 -THCV. *In vitro* se ha comprobado que posee actividad agonista parcial sobre los receptores CB₂, mientras que su acción a nivel de CB₁, tanto *in vivo* como *in vitro* es dependiente de concentración, comportándose como antagonista a dosis bajas y como agonista a dosis altas (Pertwee, 2008).

También pertenecen a este grupo los análogos estructurales sintéticos del Δ^9 -THC con benzopirano, entre los que destacan el 11-hidroxi- Δ^8 -THC-dimetilheptilo (HU-210), que es el agonista cannabinoide más potente hasta el momento (Mechoulam *et al.*, 1988), el

11-hidroxi-hexahidrocannabinol-dimetilheptilo (HU-243; Howlett *et al.*, 1990) o la nabilona (Lemberger y Rowe, 1975).

Cannabinoides no clásicos

El grupo de los cannabinoides no clásicos está formado por análogos bicíclicos y tricíclicos del Δ^9 -THC que carecen del anillo pirano. El más conocido es el cannabinoide bicíclico CP-55,940 (Fouda *et al.*, 1987), capaz de unirse tanto a CB₁ como a CB₂ y que es cinco veces más potente que el Δ^9 -THC. También es importante el cannabinoide bicíclico HU-308, debido a su agonismo selectivo por el receptor CB₂ (Hanus *et al.*, 1999).

Aminoalquilindoles

El grupo de los aminoalquilindoles son moléculas con una estructura relacionada con la pravadolina, es decir, sin un esqueleto de benzopireno. El más conocido y utilizado en investigación es el WIN-55,212-2 (Haycock *et al.*, 1990, D'Ambra *et al.*, 1992) que se caracteriza por presentar una alta afinidad y eficacia por ambos receptores, aunque mayor por CB₂. De hecho, se han desarrollado agonistas selectivos de CB₂ a partir del WIN-55.212-2 como el 1-propil-2-metil-3-(1-naftoil)indol (JWH-015; Griffin *et al.*, 1997) y el (1-(2,3-diclorobenzoil)-2-metil-5-metoxi-3-(2-[1-morfolino]etil)indol; L-768,242 o GW405833; Huffman, 2000, Valenzano *et al.*, 2005).

Eicosanoides

Los eicosanoides derivan del ácido araquidónico y comparten similitud estructural con los endocannabinoides, por ejemplo, a partir de la modificación de la AEA, se han desarrollado la metanandamida (AM-356), más potente que la AEA debido a que resiste más la degradación por parte de FAAH (Abadi *et al.*, 1994), y los agonistas selectivos ACEA y la araquidonoilciclopropilamida (ACPA; Hillard *et al.*, 1999), entre otros. También la metanandamida presenta cierta selectividad por el receptor CB₁ (Luk *et al.*, 2004).

Antagonistas de los receptores cannabinoides

El uso de moléculas que bloquean selectivamente los receptores cannabinoides es una herramienta fundamental en el estudio del Sistema Endocannabinoide, junto con el uso de ratones *knock-out* para estos receptores, ya que sirven para distinguir si un efecto se debe

a mecanismos dependientes de un receptor cannabinoide específico. La mayoría de los fitocannabinoides no actúan como antagonistas, salvo el caso del Δ^9 -THCV que actúa como antagonista CB₁ a dosis bajas o el CBD que puede actuar como antagonista CB₁/CB₂ *in vitro* (Pertwee, 2008). El SR141716A (rimonabant) fue el primer antagonista selectivo CB₁ sintetizado (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). A partir del rimonabant, se sintetizaron poco después el AM251 y el AM281 (Gatley *et al.*, 1996, Gatley *et al.*, 1998). Los antagonistas CB₂ más utilizados son el SR144528 (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998) y el AM630 (Pertwee *et al.*, 1995). La mayor parte de los antagonistas no sólo bloquean los receptores, sino que se comportan como agonistas inversos disminuyendo su capacidad de señalización, lo que en algunas aplicaciones terapéuticas para las que han sido investigados, ha supuesto un problema añadido, como en el ensayo clínico con rimonabant para el tratamiento de la obesidad, donde se observó que empeoraba el estado emocional de los pacientes pudiendo provocar depresión y tendencia al suicidio (Buggy *et al.*, 2011).

Modificadores del tono endocannabinoide

Se han denominado como agonistas indirectos a los inhibidores de la inactivación de los endocannabinoides, como son los inhibidores de la proteína transportadora AMT y los inhibidores de las enzimas de degradación de endocannabinoides. Actúan aumentando el tono endocannabinoide y sobre todo, prolongan la acción biológica de los endocannabinoides, que activan los receptores durante más tiempo. Por ejemplo, el efecto de la AEA se puede prolongar mediante el uso de inhibidores de la enzima FAAH como el URB-597 (Mor *et al.*, 2004), mientras que el efecto del 2-AG se puede prolongar mediante inhibidores de la MAGL, como el JZL184 (Long *et al.*, 2009), o inhibidores de la enzima ABHD6 (Hsu *et al.*, 2013). Respecto a los inhibidores del transporte de endocannabinoides, aunque su existencia es controvertida, se han desarrollado compuestos que parecen bloquearlo, como el AM-404 (Beltramo *et al.*, 1997), VDM11 (De Petrocellis *et al.*, 2000) o el UCM707 (López-Rodríguez *et al.*, 2001) y que han sido propuestos como evidencia experimental de la existencia de este transportador.

Aunque los mecanismos no están completamente estudiados por el momento, el

uso de moduladores alostéricos de los receptores cannabinoides también podría potenciar el tono endocannabinoide (Baillie *et al.*, 2013). Price *et al.* publicaron en 2005 la existencia de los primeros moduladores alostéricos del receptor CB₁ (como el Org 27569) y ya se tiene evidencia de los primeros modulares alostéricos del receptor CB₂, aunque los resultados aún están pendientes de ser publicados (Morales *et al.*, datos no publicados). Tanto los reguladores alostéricos del receptor CB₁, como del CB₂, ya sean positivos o negativos, presentan un interesante horizonte para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas a manipular el Sistema Endocannabinoide (Ross, 2007, Abood, 2016).

Señalización mediada por receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides son proteínas integrales de membrana con 7 dominios transmembrana que están acoplados a las proteínas G heterotriméricas en la cara intracelular de la membrana. El sitio de unión del ligando se encuentra en el interior de la región que atraviesa la membrana. Para activar al receptor, los ligandos tienen que difundir lateralmente por la membrana lipídica e interactuar con la ranura hidrofóbica entre las hélices 3 y 6 (Makriyannis *et al.*, 2005). Esta interacción provoca un cambio conformacional que produce la activación de la proteína G.

Canónicamente, los receptores cannabinoides, están acoplados a proteínas G_{i/o}, por lo que tras su activación, la subunidad G_α inhibe a la enzima adenilato ciclasa, inhibiendo la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La subunidad G_{βγ} puede activar diferentes vías de señalización como la de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)-Akt o la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) como p38 o la quinasa Jun-N_{terminal} (JNK; Liu *et al.*, 2000, Rueda *et al.*, 2000, Herrera *et al.*, 2005), regulando procesos de supervivencia celular. Esta subunidad G_{βγ} también inhibe los canales de Ca²⁺ N, P y Q y los canales D de K⁺ (Felder *et al.*, 1995, Pertwee, 1997, McAllister *et al.*, 1999).

Sin embargo, y bajo determinadas circunstancias, también se acoplan a proteínas G_s, e incluso G_q y G₁₃, provocando una elevación de los niveles de AMPc (Glass y Felder, 1997, Bonhaus *et al.*, 1998, Lauckner *et al.*, 2005, Demuth y Molleman, 2006). Así mismo, a través

de la proteína Gi/o o a través de Gq/11 (Zoratti *et al.*, 2003, Lograno y Romano, 2004, Lauckner *et al.*, 2005), los cannabinoides pueden activar la enzima PLC, que hidroliza el PIP₂ dando lugar a la formación de los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y DAG (Mombouli *et al.*, 1999, De Petrocellis *et al.*, 2007), y un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular por activación de los receptores de IP₃ del retículo endoplasmático y la activación de la proteína quinasa C (PKC) respectivamente (Netzeband *et al.*, 1999, Howlett y Mukhopadhyay, 2000).

Por otro lado, la activación del receptor CB₁ es capaz de aumentar la producción de óxido nítrico (NO) a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva (cNOS). Este NO puede reprimir la expresión del factor nuclear κB (NF-κB), implicado en la regulación de varios genes de inflamación como la iNOS y la IL-6 (Fimiani *et al.*, 1999). Por otro lado, la activación del receptor CB₂ produce una disminución de la expresión de las enzimas pro-inflamatorias COX-2 e iNOS (Castillo *et al.*, 2010).

Además, los receptores CB₁, pueden modular la hidrólisis de esfingomielina al activar la enzima esfingomielinasa (SMasa), aumentando así los niveles de ceramida (Sánchez *et al.*, 1998, Gómez Del Pulgar *et al.*, 2002). A su vez, esta acumulación de ceramida induce una respuesta de estrés en el retículo endoplásmico que desencadena la inducción sucesiva de la proteína de estrés p8, los factores de transcripción ATF-4 y CHOP y la pseudoquinasa TRB3, implicados en los procesos de muerte celular (Galve-Roperh *et al.*, 2008).

A través de los receptores CB₁ y CB₂ se puede controlar la expresión de genes de expresión temprana como EGR1 (Bouaboula *et al.*, 1995, Bouaboula *et al.*, 1996), así como modular los factores de transcripción CREB/ATF y Fos, entre otros (Herring *et al.*, 1998, Kaminski, 1998). Aunque en este tipo de modulación también puede estar mediada por los receptores PPAR.

Por último, es importante resaltar que los receptores cannabinoides también pueden formar heterómeros entre sí y con otros receptores de membrana acoplados a proteínas G como receptores opioides, D₁, D₂, A_{2A} y GPR55 (Wager-Miller *et al.*, 2002, Ferré *et al.*, 2009, Callen *et al.*, 2012, Kargl *et al.*, 2012). Estos heterómeros poseen características funcionales propias, que pueden ser diferentes a las de los receptores que los constituyen. Así,

la oligomerización constituye un mecanismo por el cual un mismo GPCR puede presentar funcionalidades diferentes y específicas (Ferré *et al.*, 2009). Aunque este fenómeno necesita de un mayor estudio y clarificación, parece que la formación de heterómeros podría modificar la señalización mediada por los receptores cannabinoides y puede tener una importante influencia en el diseño de estrategias farmacológicas. En concreto, en el estriado se ha comprobado en ratas la existencia de heterómeros CB₁-D₂ y CB₁-A_{2A} en las neuronas

GABAérgicas y glutamatérgicas (Pickel *et al.*, 2006, Carriba *et al.*, 2007). En estas preparaciones, la estimulación de los receptores CB₁ disminuía la afinidad de los receptores D₂ por la DA, y sugieren que los agonistas CB₁ pueden producir hipoquinesia debido a su capacidad de interacción con los receptores D₂ (Martín *et al.*, 2008, Ferré *et al.*, 2009). Además, parece ser que la activación del heterómero CB₁-A_{2A} necesita necesariamente de la estimulación del receptor A_{2A} (Carriba *et al.*, 2007).

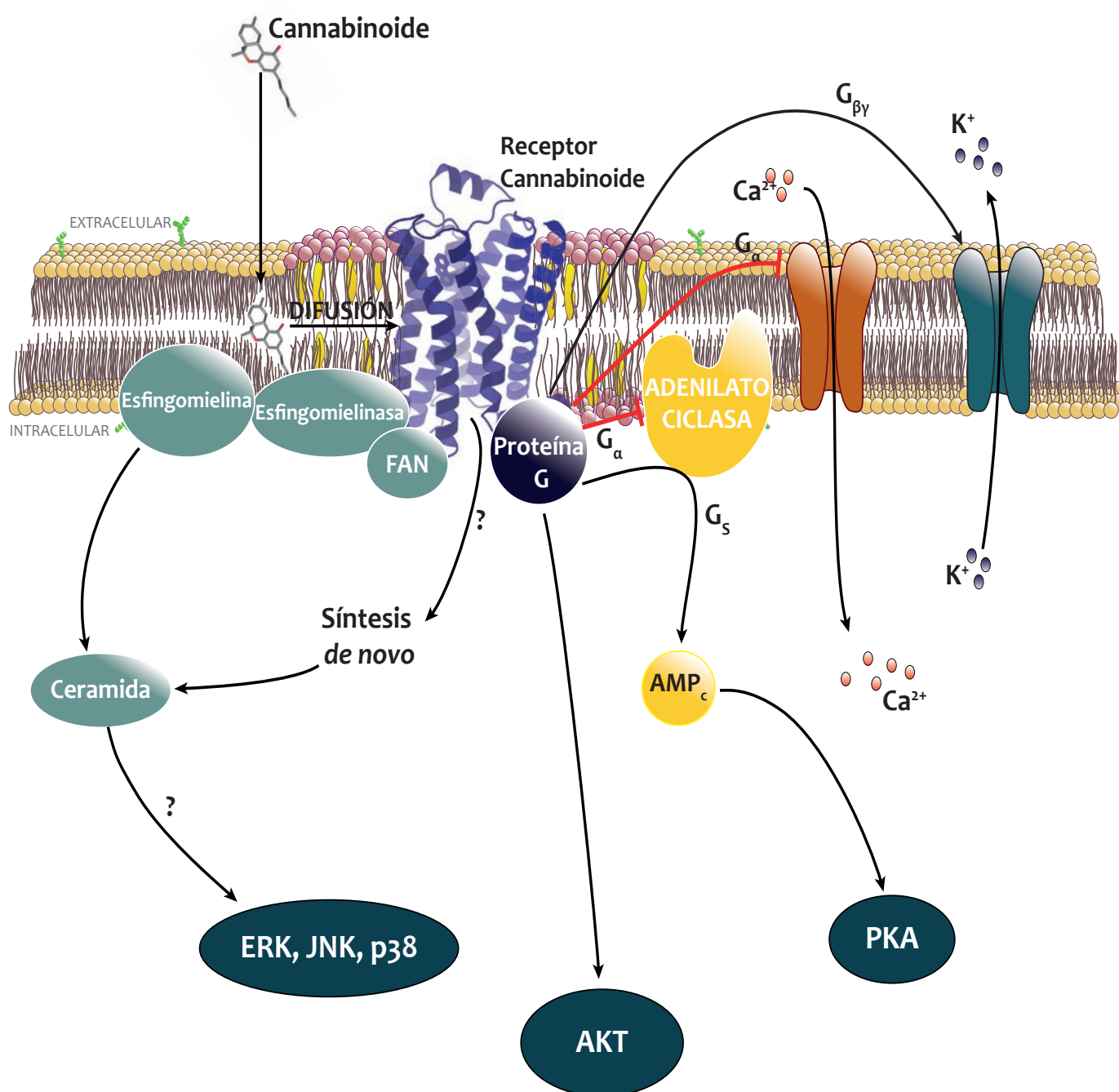


Figura 14. Los cannabinoides actúan a través de receptores acoplados a proteínas G. Cuando el agonista activa el receptor cannabinoide, la subunidad G α , dependiendo de la proteína G, inhibirá o activará a la adenilato ciclasa, influyendo sobre la vía de la PKA. La subunidad G $\beta\gamma$ puede cerrar los canales de Ca²⁺ y abrir los de K⁺, activar la vía AKT y diferentes MAPK como ERK, JNK o p38 mediante la generación de ceramida. Basado en la imagen de Guzmán (2003), los mecanismos se han simplificado para una mayor claridad de la figura.

Procesos fisiológicos mediados por el Sistema Endocannabinoide

El Sistema Endocannabinoide está implicado en multitud de procesos fisiológicos en el SNC, y periférico (Maccarrone *et al.*, 2015), pero también a nivel de los sistemas inmune (Cabral y Staab, 2005) y cardiovascular (Pacher y Steffens, 2009). En el SNC, la mayoría de las acciones parecen estar mediadas por el receptor CB₁, por ser el GPCR más abundante en el cerebro. Aunque tampoco se descarta que algunos de estos efectos puedan estar mediados total o parcialmente por los receptores CB₂ (Morgan *et al.*, 2009, Onaivi *et al.*, 2012) e incluso a través de mecanismos alternativos (Castillo *et al.*, 2012). Entre estas funciones destacan las implicadas en la regulación de la actividad sináptica y la comunicación neurona-astrocito.

Modulación de la actividad sináptica por endocannabinoides

Los endocannabinoides son importantes moduladores de la transmisión sináptica en el SNC. Son sintetizados *a demanda* tras la llegada de diferentes estímulos fisiológicos o fisiopatológicos y actúan en las proximidades del lugar donde se liberan. Regulan la liberación de neurotransmisores y la diferenciación y supervivencia neuronal (Derkinderen *et al.*, 1996, Rueda *et al.*, 2002, Galve-Roperh *et al.*, 2008). Estos mecanismos están regulados mediante señalización retrógrada, no-retrógrada y la comunicación neurona-astrocito.

Señalización retrógrada

El principal mecanismo por el cual los endocannabinoides regulan la función sináptica es la señalización retrógrada. Tras la llegada del impulso nervioso, despolarización del botón presináptico y posterior entrada de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje, los neurotransmisores son liberados a la hendidura sináptica (Kano *et al.*, 2009). Entonces, se unen a su receptor postsináptico produciendo la entrada de Ca²⁺, y con ella, la síntesis de endocannabinoides a cargo de NAPE y DAGL (Freund *et al.*, 2003). Una vez liberados al espacio sináptico, los endocannabinoides se unen a los receptores CB₁ del terminal presináptico y modulan la liberación de GABA, glutamato u otros neurotransmisores (Hoffman y Lupica, 2000, Robbe *et al.*, 2001). El objetivo de esta modulación es controlar el exceso de transmisión

excitatoria (glutamato) o inhibitoria (GABA), y evitar las consecuencias de su desequilibrio (excitotoxicidad o inhibición de la actividad eléctrica) por lo que se puede considerar a los endocannabinoides y receptores cannabinoides como reguladores de la homeostasis sináptica (Moser, 1989).

Comunicación neurona-astrocito

Además de a través de la señalización retrógrada, los endocannabinoides modulan indirectamente la función sináptica mediante la comunicación neurona-astrocito en lo que se ha definido como sinapsis tripartita. Cuando los receptores cannabinoides presentes en los astrocitos se activan, pueden provocar la liberación de glutamato por parte de los propios astrocitos (gliotransmisión), que actuaría sobre las neuronas adyacentes (Navarrete y Araque, 2010, Castillo *et al.*, 2012, Navarrete *et al.*, 2014). De esta manera y a través de la actividad del astrocito, una sinapsis en una zona determinada puede activar neuronas con las que no está en contacto directo, aumentando las posibilidades de comunicación y la versatilidad de este proceso (Pérez-Alvarez y Araque, 2013).

Procesos neurobiológicos con participación del Sistema Endocannabinoide

Dado que el Sistema Endocannabinoide participa en funciones muy básicas de la comunicación neuronal y con otros tipos de células neurales, y que su presencia en el SNC es bastante amplia, se puede asumir que tiene funciones moduladoras en la mayor parte de los procesos neurobiológicos regulados a nivel del SNC.

Memoria

Los cannabinoides capaces de activar los receptores CB₁ presentes en el hipocampo pueden provocar una inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP) necesaria para la plasticidad sináptica (Heifets *et al.*, 2008) mediante mecanismos que dependen de mTOR o la activación de COX-2 (Puighermanal *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2013). Se explicarían así los déficits de memoria a corto plazo sufridos tras el consumo de cannabinoides (Lichtman y Martin, 1996). Así mismo, y a través de los receptores CB₁, los cannabinoides pueden facilitar la extinción de los recuerdos aversivos (Lutz, 2007).

Ansiedad

Los cannabinoides pueden activar el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, responsable de la respuesta a emociones y estrés. Se ha observado un comportamiento ansiogénico en ratones *knock-out* para el receptor CB₁ (Martin *et al.*, 2002), al igual que en humanos tratados con rimonabant, antagonista CB₁ (Christensen *et al.*, 2007). Los inhibidores de FAAH y MAGL tienen efecto ansiolítico aumentando los niveles de AEA y 2-AG, aunque parece que AEA estaría actuando a través del receptor CB₁ pero 2-AG lo estaría haciendo a través del receptor CB₂ (Busquets-García *et al.*, 2011).

Nocicepción

Uno de los principales efectos farmacológicos de los cannabinoides se produce a nivel de la nocicepción, con los agonistas CB₁, y en menor medida con los agonistas CB₂, provocando analgesia (Khasabova *et al.*, 2011, Murineddu *et al.*, 2013). Ello se debe a la presencia del Sistema Endocannabinoide en las áreas del SNC y periférico implicadas en la respuesta nociceptiva, y siempre en clara asociación con el Sistema Opiode endógeno con el que interacciona (Walker y Hohmann, 2005, Nadal *et al.*, 2013). CB₁ está presente en las áreas supraespinales que regulan el dolor, como las áreas talámicas y la sustancia gris periacueductal (Esmaeili *et al.*, 2016), pero también a nivel espinal, en determinadas poblaciones neuronales implicadas en la respuesta al dolor (Zheng *et al.*, 2015), y junto con CB₂ en las neuronas sensoriales que registran los estímulos dolorosos (Walker y Hohmann, 2005, Nyilas *et al.*, 2009). Además, en situaciones de dolor crónico, los niveles de endocannabinoides se incrementan, supuestamente como mecanismo de defensa fisiológico (Sagar *et al.*, 2010, Pellkofer *et al.*, 2013).

Apetito

El SNC integra señales del hígado, tracto gastrointestinal y tejido adiposo en el hipotálamo anterior, donde actúan las orexinas, hormonas relacionadas con la regulación de la sensación de hambre/saciedad (Yi y Tschop, 2012). El Sistema Endocannabinoide regula la integración de estas señales tanto a nivel periférico como hipotalámico, de forma que durante el ayuno los niveles de AEA y 2-AG en el hipotálamo aumentan, mientras que éstos disminuyen tras la ingesta de comida, en un proceso mediado

por la leptina (Di Marzo *et al.*, 2001, Kirkham *et al.*, 2002, Hanus *et al.*, 2003). Un tercer nivel de regulación implica a los receptores CB₁ y endocannabinoides localizados en las áreas (como el núcleo *accumbens*) que regulan el efecto reforzante provocado por el alimento (Dazzi *et al.*, 2014). En los tres niveles (límbico, hipotalámico y periférico), la activación del receptor CB₁ incrementa el apetito incluso en animales recién alimentados, mientras que el bloqueo de estos receptores produce el efecto contrario (Jamshidi y Taylor, 2001), motivo por el que se desarrollaron varios antagonistas, principalmente rimonabant, como tratamiento contra la obesidad y sus consecuencias como el síndrome metabólico (Hildebrandt *et al.*, 2003, Silvestri y Di Marzo, 2012).

Émesis

Los procesos que regulan los reflejos de náusea y el vómito también dependen del hipotálamo anterior y del área póstrema localizada en el bulbo raquídeo (Hornby, 2001). La activación de los receptores CB₁, y recientemente se ha descubierto que también los CB₂, en estas áreas producen una inhibición de estos reflejos (Mechoulam y Hanu, 2001, Rock *et al.*, 2016), lo que ha derivado en que una de las primeras aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, principalmente los agonistas CB₁, haya sido su capacidad antiemética útil en el tratamiento de la náusea y el vómito provocados por la quimioterapia (Sallan *et al.*, 1975, Smith *et al.*, 2015), como es el caso de la nabilona (Cesamet®; Herman *et al.*, 1977).

Hipotermia

Otro efecto que parece estar mediado por los receptores CB₁ del hipotálamo y el sistema periférico es la capacidad de sus agonistas para reducir la temperatura corporal, que también estarían actuando a través de la inhibición de la liberación de GABA (Rawls *et al.*, 2004).

Control del movimiento

El control del movimiento requiere de la coordinación de diferentes regiones del SNC y en todas ellas el Sistema Endocannabinoide está presente y juega un papel fundamental (El Manira y Kyriakatos, 2010). A grandes rasgos, la planificación del movimiento depende de la corteza motora (Georgopoulos y Carpenter, 2015), la selección de los movimientos adecuados y el desarrollo de automatismos depende de

los ganglios basales (Hikosaka y Isoda, 2010) y el cerebelo contribuye al aprendizaje y a la coordinación (Thach, 1998), aunque hay más áreas implicadas en la transmisión de las señales como la médula espinal (Dimitrijevic *et al.*, 2015), y de la ejecución del movimiento como la unión neuromuscular (Plomp *et al.*, 2015).

En los ganglios basales, el Sistema Endocannabinoide tiene un importante papel como sistema modulador. La activación de los receptores CB₁ produce alteraciones en el control del movimiento a través de su acción directa sobre la liberación de GABA en sustancia *nigra* y globo pálido (Romero *et al.*, 2002), y glutamato en las proyecciones corticoestriatales y, sobre todo, subtalámicas que regulan a las neuronas nigrales (Fernández-Ruiz *et al.*, 2010), y de forma indirecta sobre la liberación de DA en la sustancia *nigra* (Giuffrida y Piomelli, 2000, González *et al.*, 2005, García *et al.*, 2015). Esto justificaría el efecto hipoquinético de los agonistas cannabinoides y el efecto contrario cuando la actividad endocannabinoide se inhibe (Romero *et al.*, 1995, Cadogan *et al.*, 1997, Fernández-Ruiz y González, 2005).

En el cerebelo, el Sistema Endocannabinoide también media la supresión de la transmisión sináptica inhibitoria o excitatoria a través de la activación del receptor CB₁ que produce cambios en las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas de las células de Purkinje, regulando la coordinación y ejecución de movimientos precisos (Kreitzer y Regehr, 2001, Diana *et al.*, 2002). Un exceso de activación del receptor CB₁ se ha relacionado con descoordinación motora (ataxia), mientras que el bloqueo de estos receptores produce el efecto contrario, de forma que podría tener valor terapéutico en patologías con disfunción o daño cerebelar y con ataxia como principal síntoma (Arjmand *et al.*, 2015).

Mecanismos neuroprotectores de los cannabinoides

Además de las funciones moduladoras ejercidas por el Sistema Endocannabinoide a nivel nociceptivo, motor, sobre el apetito, la émesis y la memoria que se han descrito en el apartado anterior, otra de las funciones relevante en la que este sistema parece participar es la regulación de la decisión muerte/supervivencia en las células neurales (Guzmán *et al.*, 2001). Este hecho afecta a los diferentes tipos de células neurales, pero es

particularmente relevante para las neuronas dado el carácter postmitótico de estas células, que impide su división celular, relegando la posibilidad de sustitución de neuronas dañadas solo al potencial de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto, algo que de momento parece bastante limitado (Taupin, 2006). En esta Tesis Doctoral nos vamos a interesar por la supervivencia neuronal, pero es importante resaltar que esta decisión supervivencia/muerte actúa en ambos sentidos y que es la responsable del carácter antitumoral demostrado por los cannabinoides que inducen la apoptosis de células transformadas en gliomas mediante su acción sobre los receptores CB₁ y CB₂ (Aguado *et al.*, 2007). En nuestro caso, nos interesa la posibilidad de preservar las células sanas en diferentes condiciones de daño neurotóxico, principalmente neuronas, e incluso rescatarlas, repararlas o sustituirlas (Gowran *et al.*, 2011, Fagan y Campbell, 2014). En este sentido, tanto los endocannabinoides como agonistas de los receptores cannabinoides son capaces de activar vías de señalización encargadas de reparar el daño neuronal, atribuyendo a estos compuestos un efecto neuroprotector (van der Stelt y Di Marzo, 2005). Además de los agonistas, en algunos casos el efecto neuroprotector es causado por compuestos con baja afinidad por los receptores cannabinoides, como el CBD, que poseen capacidad protectora debido a su carácter antioxidante y a través de mecanismos independientes de receptores cannabinoides (Fernández-Ruiz *et al.*, 2013), como los receptores 5HT_{1A}, el transportador de adenosina, los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y, sobre todo, los receptores nucleares PPAR (Carrier *et al.*, 2006, Sun y Bennett, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2013, Sánchez-Blázquez *et al.*, 2014). Los mecanismos moleculares implicados son muy diversos, y frecuentemente, complementarios.

Desde hace tiempo se ha venido investigando si estas propiedades neuroprotectoras de los cannabinoides pueden resultar interesantes en el tratamiento de las enfermedades en las que el SNC sufra degeneración, tanto en episodios agudos (isquemia, trauma cerebral, lesión medular)(Fernández-Ruiz *et al.*, 2015, Arévalo-Martín *et al.*, 2016) como situaciones crónicas (Alzheimer, Huntington, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Parkinson)(Fernández-Ruiz *et al.*, 2011, Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). La manipulación del Sistema Endocannabinoide

en este sentido, ha proporcionado buenos resultados en modelos preclínicos de isquemia (Schmidt *et al.*, 2012), Alzheimer (Bisogno y Di Marzo, 2008), Parkinson (García-Arencibia *et al.*, 2007, García-Arencibia *et al.*, 2009), Huntington (Sagredo *et al.*, 2009, Valdeolivas *et al.*, 2015), esclerosis múltiple (Moreno-Martet *et al.*, 2015) y esclerosis lateral amiotrófica (Pryce *et al.*, 2015).

Los principales mecanismos a través de los cuales los cannabinoides pueden estar ejerciendo su potencial neuroprotector son los siguientes:

Efectos antiexcitotóxicos

En los procesos neurodegenerativos se produce una liberación masiva de aminoácidos excitatorios como el glutamato, que al interactuar con diferentes receptores celulares como el receptor NMDA, produce una entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas, lo que ocasiona una sobreactivación de mecanismos celulares dependientes de calcio que resultan ser dañinos para la célula (Sattler y Tymianski, 2000, Dong *et al.*, 2009). La entrada masiva de iones Ca^{2+} en el interior celular produce la activación de diferentes enzimas de degradación, proteínas quinasas, así como la generación de radicales libres por daño mitocondrial. Además, el calcio intracelular también puede penetrar en el núcleo neuronal y activar el ciclo apoptótico para provocar la muerte de la neurona (Sattler y Tymianski, 2000). A este fenómeno se lo conoce como excitotoxicidad. Los cannabinoides poseen claros efectos antiexcitotóxicos dado que, mediante la activación de los receptores CB_1 presinápticos, pueden disminuir la liberación de glutamato, previniendo así la muerte neuronal por el exceso de transmisión excitatoria (Gilbert *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010, Zoppi *et al.*, 2011). Los agonistas CB_1 han demostrado también disminuir la excitotoxicidad mediante la activación de la vía $\text{PI3K/Akt/mTORC1/BDNF}$ (Molina-Holgado *et al.*, 2002, Khaspekov *et al.*, 2004, Butovsky *et al.*, 2005, Blázquez *et al.*, 2015), la inhibición de PKA y la generación de NO (Kim *et al.*, 2006). Además, los agonistas cannabinoides, actuando sobre los receptores CB_1 , pueden cerrar los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, evitando la entrada masiva de calcio asociada con la excitotoxicidad y la activación de los procesos citotóxicos dependientes de este catión (Fowler *et al.*, 2003, Iannotti *et al.*, 2014).

Efectos antiinflamatorios

Las células gliales son las más numerosas del SNC. Se encargan de dar apoyo trófico y metabólico a las neuronas y ayudan al mantenimiento de la barrera hematoencefálica. En situaciones patológicas se dice que la respuesta glial es un *arma de doble filo* ya que durante un episodio agudo de inflamación puede producir factores tróficos y antiinflamatorios, y durante la neuroinflamación crónica puede liberar factores pro-inflamatorios y tóxicos al entorno neuronal (Allan y Rothwell, 2001, Streit *et al.*, 2004, Drechsel *et al.*, 2012). Los cannabinoides pueden ser una buena estrategia farmacológica en ambas situaciones. Los receptores CB_2 están especialmente presentes en microglía reactiva y los niveles de expresión de este receptor se encuentran muy elevados en condiciones patológicas, pero no en situaciones normales (Benito *et al.*, 2005, Concannon *et al.*, 2015). Mediante la activación de los receptores CB_2 , por un lado, se podría reducir la producción de citoquinas proinflamatorias ($\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$) así como de otros mediadores inflamatorios como NO y el factor de transcripción $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Correa *et al.*, 2005, Esposito *et al.*, 2006). Por otro lado, los cannabinoides pueden potenciar la liberación de citoquinas antiinflamatorias y moléculas pro-supervivencia ($\text{TGF-}\beta$, IL-10) principalmente por los astrocitos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007), aunque también se podrían conseguir efectos antiinflamatorios a través de CB_1 , e incluso receptores PPAR (Molina-Holgado *et al.*, 1997, Stella, 2004, Correa *et al.*, 2007). En línea con esta actuación dual de los cannabinoides de reducir factores proinflamatorios a la par que activar la generación de factores protectores, en los últimos años se han realizado estudios que demuestran cómo los cannabinoides (principalmente vía CB_2) facilitan la conversión M1 a M2 de la microglía reactiva (Mecha *et al.*, 2015).

Efecto antioxidante

Uno de los principales eventos citotóxicos, especialmente dañino en el tejido nervioso por su alta dependencia del metabolismo oxidativo de la glucosa, es el estrés oxidativo, que se desencadena tras la elevación de Ca^{2+} intracelular y la activación de una serie de enzimas generadoras de factores neurotóxicos, como la NOS, potenciándose la producción de NO y de peroxinitritos. También por el daño mitocondrial, que es la principal fuente de ROS,

por ejemplo el radical superóxido y peróxido de hidrógeno que pueden contribuir a la formación de peroxinitritos. Estos eventos producen oxidación y desnaturalización de proteínas, peroxidación de los lípidos de la membrana y daños en el ADN, procesos que conllevan en último término a la muerte celular (Moncada y Bolaños, 2006).

La estructura de varios cannabinoides contiene grupos fenólicos que les confieren un potente carácter antioxidante, pudiendo actuar como meros secuestradores de ROS mediante mecanismos independientes de unión a receptor (Marsicano *et al.*, 2002). Por ejemplo, el CBD tiene un poder antioxidante mayor que el del tocoferol (Borges *et al.*, 2013). Otros cannabinoides con potencial antioxidante debido a su estructura química son el CBG, Δ^9 -THC y Δ^9 -THCV, y los sintéticos nabilona, levonantradol y dextranabinol, entre otros (Marsicano *et al.*, 2002). Aunque este efecto directo secuestrando ROS y actuando como meros lavadores parece claro, en los últimos años se ha barajado la posibilidad de que los cannabinoides actúen como antioxidantes mediante mecanismos dependientes de señales intracelulares, por ejemplo, a través de la activación de PPAR α (Sun *et al.*, 2007) y/o la movilización de factores de transcripción como Nrf-2 implicados en la respuesta antioxidante de fase II o inducible (Juknat *et al.*, 2013).

Regulación de factores neurotróficos

En general, las enfermedades neurodegenerativas suelen estar acompañadas de una disminución en factores neurotróficos, moléculas esenciales para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las neuronas maduras en el SNC, a veces la disminución se produce en sus receptores celulares (Sofroniew *et al.*, 2001). En concreto, el factor BDNF se encuentra disminuido en la enfermedad de Huntington, EP y Alzheimer (Zuccato y Cattaneo, 2009) y el factor GDNF es esencial para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y se ha encontrado disminuido en modelos de la EP (Björklund *et al.*, 2000, d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2015). Por el contrario, se ha demostrado que la administración crónica de Δ^9 -THC puede aumentar los niveles BDNF (Butovsky *et al.*, 2005), que la AEA promueve la fosforilación de la quinasa de adhesión focal (FAK), que juega un importante papel en la plasticidad sináptica (Derkinderen *et*

al., 1996) y que los agonistas CB₁ reducen la excitotoxicidad a través de la activación de la vía PI3K/Akt/mTORC1 (Molina-Holgado *et al.*, 2002, Khaspekov *et al.*, 2004, Blázquez *et al.*, 2015). En cuanto a GDNF, aún no existen muchas evidencias del efecto terapéutico de los cannabinoides sobre este factor, pero el grupo de Ma *et al.*, (2015) consiguió incrementar los niveles de GDNF en un modelo de inflamación con LPS mediante el uso del agonistas CB₂ AM1241 en cultivo celular.

Efectos sobre la autofagia

En la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas se producen proteínas defectuosas, que no son eliminadas porque fallan los mecanismos clásicos de proteólisis (UPS) que las eliminan en primera instancia, de forma que acaban formando agregados que dañan la homeostasis neuronal y provocan la muerte de las neuronas (Son *et al.*, 2012). Estos agregados podrían ser eliminados o, al menos, reducidos a través de la autofagia, pero en muchas de estas enfermedades, los mecanismos de autofagia también están limitados (Martínez-Vicente, 2015). Se ha propuesto que los cannabinoides también podrían ser neuroprotectores a través de la activación de la autofagia (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). Datos obtenidos en el estudio de la actividad antitumoral de ciertos cannabinoides avalan la actividad pro-autofágica de estos derivados (Salazar *et al.*, 2009). Además, cuando se ha estudiado en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas, se ha visto que varios agonistas cannabinoides sintéticos han demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, capacidad para disminuir los depósitos de proteína β -amiloide en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Ramírez *et al.*, 2005), aunque también se ha propuesto que la disminución de los depósitos de proteína β -amiloide los provocaba la acción fagocitaria de las células de microglía (Tolón *et al.*, 2009). También que la combinación de los fitocannabinoides Δ^9 -THC y CBD disminuía la gliosis y estrés oxidativo, mejorando la función de las chaperonas y reduciendo los depósitos de proteínas anómalas mediante la inducción de la autofagia en un modelo de demencia frontotemporal (Casarejos *et al.*, 2013).

Efectos neurogénicos

Como ya se ha comentado, los cannabinoides tienen un importante papel en los mecanismos

de diferenciación y proliferación neurales tanto en cerebro en desarrollo como en cerebro adulto (Palazuelos *et al.*, 2006, Díaz-Alonso *et al.*, 2012) y en la migración de factores de proliferación a los sitios de lesión (Aguado *et al.*, 2007, Rubio-Araiz *et al.*, 2008). Por lo tanto, otro mecanismo inducido por los cannabinoides con potencial terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas sería su capacidad de

inducir la aparición de células nuevas, sobre todo neuronas, pero también células gliales, por ejemplo, oligodendrocitos (Arévalo-Martín *et al.*, 2012) para reemplazar las dañadas (Prenderville *et al.*, 2015). Este potencial es especialmente interesante en patologías en las que la aparición de los síntomas es tardía y después de un importante grado de pérdida neuronal, como la EP (Dexter y Jenner, 2013).

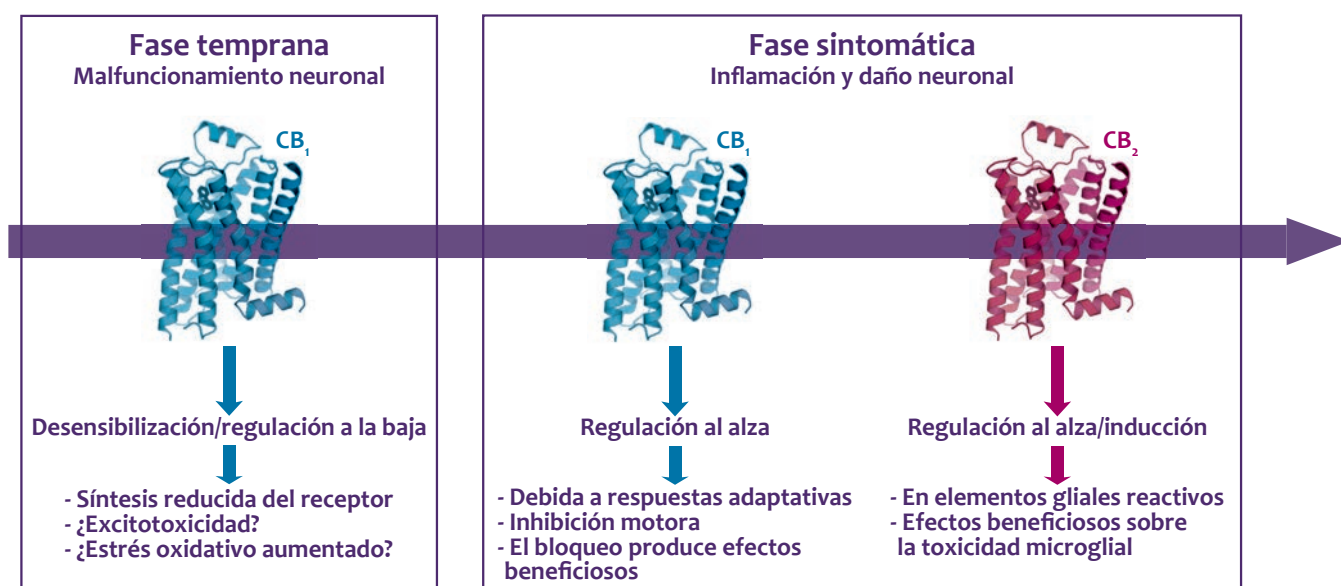
Sistema Endocannabinoide en la Enfermedad de Parkinson

Los pacientes de EP podrían beneficiarse potencialmente de la utilización de medicamentos basados en cannabinoides si nos apoyamos en los cambios experimentados por el Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales durante el transcurso de la enfermedad. Estos cambios se han detectado en modelos animales (Lastres-Becker *et al.*, 2001, Gubellini *et al.*, 2002) y en pacientes, utilizando tejido *post mortem* (Lastres-Becker *et al.*, 2001), mediante el análisis *in vivo* del SNC por tomografía de emisión de positrones (PET; Van Laere *et al.*, 2012) o por determinación en fluidos biológicos, por ejemplo líquido cefalorraquídeo (Pisani *et al.*, 2005).

En etapas presintomáticas tempranas, caracterizadas por mal funcionamiento de las neuronas más que por muerte neuronal, se estima que existe una regulación a la baja/desensibilización de los receptores CB₁ de la sustancia *nigra*, como ocurre en los ratones deficientes en α -sinucleína o portadores de formas mutadas de esta proteína, o incluso en ratones deficientes en parkina (García-Arencibia *et al.*, 2009). Dado que la activación de los receptores CB₁ inhibe la liberación de glutamato, se puede esperar que esta regulación a la baja/desensibilización se asocie con un aumento de

los niveles de glutamato y por lo tanto, mayor excitotoxicidad, jugando un importante papel en la progresión de la enfermedad (García-Arencibia *et al.*, 2009).

En etapas intermedias y fases sintomáticas avanzadas, caracterizadas ya por degeneración nigral, la tendencia cambia y se produce una regulación al alza de los receptores CB₁ en las neuronas estriatales bajo el control de las neuronas dopaminérgicas que degeneran en la enfermedad. Este hecho estaría originado por las respuestas adaptativas del cerebro



y es compatible con el perfil aquinético de estos pacientes (García-Arencibia *et al.*, 2009), aunque en algunos estudios también se describen reducciones (Hurley *et al.*, 2003, Walsh *et al.*, 2010). Este tipo de respuesta se ha observado en las ratas tratadas de manera aguda con reserpina (Di Marzo *et al.*, 2000) o de forma crónica con antagonistas dopaminérgicos (Mailleux y Vanderhaeghen, 1993), o después de lesionar las neuronas nigroestriales con 6-OHDA (Gubellini *et al.*, 2002) o MPTP (Lastres-Becker *et al.*, 2001) en diferentes especies animales. También se encontró en los pacientes (Lastres-Becker *et al.*, 2001, Pisani *et al.*, 2005). Tras la terapia de reemplazo dopaminérgico con L-DOPA, se invierte esta hiperactividad endocannabinoide (Lastres-Becker *et al.*, 2001, Maccarrone *et al.*, 2003).

En paralelo a los cambios bifásicos del receptor CB₁ neuronal en la EP, se ha visto que la activación de los astrocitos y/o microglía que acompaña a la lesión neuronal en las estructuras afectadas en la EP se ha asociado con una elevación de los receptores CB₂ presentes en los elementos gliales reclutados en los sitios de lesión. Este hecho se ha visto inicialmente en ratones tratados con MPTP (Price *et al.*, 2009), pero no se disponía de información sobre lo que ocurre en otros modelos experimentales y en pacientes de la EP hasta la publicación de los resultados de esta Tesis Doctoral (los artículos que se pueden consultar en el Anexo) y en el artículo de Concannon *et al.* (2015) en el que se investiga la respuesta de los receptores CB₂ en diferentes modelos de parkinsonismo.

Respecto a los endocannabinoides, los niveles de AEA y 2-AG se encuentran elevados en el estriado de monos lesionados con MPTP, pero tras el tratamiento con L-DOPA, los niveles de estos endocannabinoides vuelven a la normalidad (Pisani *et al.*, 2011).

En cuanto a las disquinesias, no se ha visto una correlación clara entre el Sistema Endocannabinoide y la aparición o agravamiento de este efecto secundario de la L-DOPA. La densidad de receptores CB₁ no presenta diferencias entre pacientes con y sin disquinesia ni tampoco dependiendo de la gravedad de ésta (Van Laere *et al.*, 2012). Es posible que la clave esté en la formación de heterómeros CB₁-CB₂, A_{2A}-CB₁, A_{2A}-D₂, CB₁-D₂ y A_{2A}-CB₁-D₂ que estudios recientes han encontrado en el caudado de monos lesionados con MPTP. La

formación de estos heterómeros desaparece tras el tratamiento con L-DOPA y el desarrollo de disquinesia (Bonaventura *et al.*, 2014, Sierra *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el conjunto de las anteriores observaciones apoyan la idea de que los receptores CB₁ y CB₂, así como otros elementos del Sistema Endocannabinoide, representan, por sus cambios en la enfermedad, objetivos atractivos para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas útiles en EP. Estos nuevos medicamentos podrían aliviar los síntomas y a la vez, servir como moléculas neuroprotectoras capaces de ralentizar la progresión de la enfermedad.

Reducción de los síntomas a través del receptor CB₁

Como se ha indicado en el apartado anterior, una vez establecida la enfermedad y los síntomas han aparecido, la actividad endocannabinoide parece estar hiperactivada, en paralelo a la deficiencia de DA producida por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales que provoca la aparición de síntomas motores como la bradiquinesia, la rigidez y el temblor (Lastres-Becker *et al.*, 2001, Pisani *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2009). Como se ha visto, el Sistema Endocannabinoide puede modular la transmisión de DA en los ganglios basales de manera indirecta al actuar sobre los receptores CB₁ localizados en las neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Hoffman y Lupica, 2000, Robbe *et al.*, 2001), o sobre los receptores TRPV1 localizados en neuronas dopaminérgicas de manera directa (Price *et al.*, 2004). También puede hacerlo a través de interacciones postsinápticas entre CB₁ y los receptores D₁/D₂ o por la formación de heterómeros CB₁ con D₁ o con D₂ (Gerdeman y Fernández-Ruiz, 2008). En base a estas posibilidades, se puede pensar que este sistema es susceptible de manipulación farmacológica con el fin de restablecer la liberación de DA y aliviar así los síntomas motores (van der Stelt y Di Marzo, 2003, Fernández-Ruiz, 2009, García-Arencibia *et al.*, 2009, Pisani *et al.*, 2011). Los estudios llevados a cabo en modelos experimentales han utilizado tanto agonistas como antagonistas para el receptor CB₁, usados solos o como coadyuvantes, y se han centrado en el alivio de los síntomas parkinsonianos clásicos como temblor o bradiquinesia (Brotchie, 2003, Fernández-Ruiz, 2009, García-Arencibia

et al., 2009, Pisani *et al.*, 2011). El temblor se podría reducir con agonistas de los receptores CB₁ dados sus efectos inhibitorios sobre las neuronas glutamatérgicas subtalmonigrales (Sañudo-Peña y Walker, 1997, Sañudo-Peña *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen datos concluyentes a este respecto más allá de los testimonios de pacientes de EP que se automedican consumiendo cannabis medicinal y afirman tener menos temblores (Venderova *et al.*, 2004), ya que los pocos estudios clínicos realizados en pacientes, no permiten confirmar los efectos positivos de los agonistas CB₁ sobre el temblor (Frankel *et al.*, 1990). Además, el uso continuado de estos agonistas podría acentuar los síntomas hipoquinéticos que son también clásicos en la enfermedad (Fernández-Ruiz, 2009, García-Arencibia *et al.*, 2009).

Se han obtenido resultados algo mejores con los antagonistas del receptor CB₁ respecto al otro síntoma principal de la EP, la bradiquinesia. El bloqueo de los receptores CB₁ con rimonabant resultó ser eficaz para reducir la aquinesia y la inhibición motora en modelos experimentales de la enfermedad (Fernández-Espejo *et al.*, 2005, González *et al.*, 2006, Kelsey *et al.*, 2009), a pesar de algunos estudios que mostraban resultados contradictorios (Di Marzo *et al.*, 2000, Meschler *et al.*, 2001). Sin embargo, una vez más el único ensayo clínico llevado a cabo con antagonistas de los receptores CB₁ en pacientes parquinsonianos no confirmó los efectos positivos que se encontraron en los modelos experimentales, aunque el estudio se llevó a cabo con un grupo de pacientes que respondía bien al tratamiento con L-DOPA (Mesnage *et al.*, 2004). Es posible que el bloqueo de los receptores CB₁ funcione mejor en pacientes que tienen una peor respuesta a L-DOPA o en las fases en las que la terapia dopaminérgica clásica ya no funciona o lo hace en menor medida. Esta posibilidad puede explicarse en parte por gracias a los estudios preclínicos que demostraron que el rimonabant fue más eficaz cuando se usaba en dosis bajas (González *et al.*, 2006, Kelsey *et al.*, 2009) y en fases muy avanzadas de la enfermedad que se caracterizan por el daño extremo de la sustancia *nigra* (Fernández-Espejo *et al.*, 2005), condiciones que no fueron completamente reproducidas en el ensayo clínico. Además, estos estudios también demostraron que los efectos positivos del rimonabant fueron independientes de la transmisión dopaminérgica, y más bien relacionados con la transmisión glutamatérgica a

nivel estriatal (García-Arencibia *et al.*, 2008). Otra ventaja es que estos antagonistas del receptor CB₁ no producirían los efectos psicotrópicos que sí producen los agonistas (Izzo *et al.*, 2009).

A la reducción de los síntomas motores habría que añadir otro efecto terapéutico beneficioso de los cannabinoides sobre los síntomas no-motores que se producen en la EP, como son la depresión y el insomnio (Chung *et al.*, 2013). El fitocannabinoide CBD ha demostrado tener efectos antidepresivos y ansiolíticos (de Mello Schier *et al.*, 2014) y el rimonabant y la nabilona capacidad para facilitar el sueño (Chagas *et al.*, 2013, Whiting *et al.*, 2015).

Reducción de la disquinesia

Pese a no existir cambios en el Sistema Endocannabinoide durante la aparición y empeoramiento de la disquinesia asociada a L-DOPA, numerosos estudios realizados en los últimos 15 años han demostrado que se puede reducir farmacológicamente con ciertos compuestos cannabinoides, aunque no parece bien definido el mecanismo de acción. Por ejemplo, los agonistas del receptor CB₁ han mostrado efectos antidisquinéticos (Ferrer *et al.*, 2003, Martínez *et al.*, 2012) y una normalización en los mecanismos de señalización, por ejemplo, la activación de cAMP/PKA, que participan en las anomalías disquinéticas en modelos animales (Martínez *et al.*, 2012). Sin embargo, la validación clínica de este potencial ha producido resultados controvertidos (Sieradzan *et al.*, 2001, Carroll *et al.*, 2004). Esta controversia también se ha encontrado en los estudios preclínicos, por ejemplo, los beneficios de los agonistas CB₁ no se reprodujeron con los llamados agonistas cannabinoides indirectos como los inhibidores de FAAH, presumiblemente debido a que también son capaces de activar los receptores TRPV1 (Morgese *et al.*, 2007). De hecho, sólo mostraron propiedades antidisquinéticas con la co-administración de un antagonista del receptor TRPV1, lo que indica que los receptores CB₁ y TRPV1 trabajan en direcciones opuestas para controlar la disquinesia inducida por L-DOPA (Morgese *et al.*, 2007). Por otro lado, otro resultado conflictivo deriva de estudios que muestran que los antagonistas del receptor CB₁ son también capaces de reducir y/o retrasar la disquinesia inducida por L-DOPA (Fabbrini *et al.*, 2007), aunque su administración en combinación con L-DOPA produce algunas sinergias interesantes en relación con los síntomas motores, pero

también con la progresión de la enfermedad (Gutiérrez-Valdez *et al.*, 2013). Una vez más, esto indica la extrema complejidad del circuito de los ganglios basales en el que tanto los agonistas como los antagonistas CB₁ pueden servir para el mismo tipo de beneficio terapéutico, un hecho presumiblemente relacionado con la presencia de estos receptores tanto en sinapsis excitatorias como inhibitorias. Por último, un estudio reciente añade más complejidad al sugerir que ciertos cannabinoides como la AEA o la OEA pueden reducir las disquinesias inducidas por L-DOPA mediante la activación de los receptores PPAR (Martínez *et al.*, 2015), pero otros autores atribuyen sus efectos antidisquinéticos al bloqueo de los receptores TRPV1 en lugar de a la activación de los receptores PPAR (González-Aparicio y Moratalla, 2014).

Agonistas del receptor CB₂ para el tratamiento de los eventos inflamatorios

La presencia de receptor CB₂ en células neurales en el cerebro parece ser muy limitada, se le ha identificado en astrocitos (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014), oligodendrocitos (Molina-Holgado *et al.*, 2002), microglía quiescente (Stella, 2010) y perivascular (Núñez *et al.*, 2004), progenitores neurales (Palazuelos *et al.*, 2006) e incluso en algunas subpoblaciones neuronales (Mackie, 2005, Sierra *et al.*, 2015). Lo interesante es su sobreexpresión, sobre todo en elementos gliales, en respuesta a los eventos inflamatorios (Ashton y Glass, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010) que se producen en las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Benito *et al.*, 2003), esclerosis lateral amiotrófica (Yiangou *et al.*, 2006), Huntington (Sagredo *et al.*, 2009) y ataxias espinocerebelosas (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014), aunque las evidencias de que esto ocurra en EP son relativamente limitadas (Price *et al.*, 2009).

La sobreexpresión del receptor CB₂ en respuesta a daño (principalmente inflamatorio) se ha interpretado como una respuesta protectora endógena orientada a retrasar o detener el transcurso de la enfermedad mediante el control de la actividad inflamatoria (García-Arencibia *et al.*, 2009, Pisani *et al.*, 2011, Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). Este hecho sitúa al receptor CB₂ como una posible diana farmacológica de la EP,

aunque hasta la fecha no hay muchos estudios concluyentes en esta enfermedad. Quizá es debido a que los modelos experimentales clásicos como el de MPTP o 6-OHDA tienen una baja activación glial. En ratones lesionados con MPTP, los agonistas han dado buen resultado pese a ser un modelo poco inflamatorio (Price *et al.*, 2009), pero los resultados no se confirmaron en el modelo de ratas lesionadas con 6-OHDA (García-Arencibia *et al.*, 2007). Para evaluar el potencial de los agonistas del receptor CB₂ en EP se deberían utilizar modelos en los que la degeneración se produzca por eventos inflamatorios como el modelo de lesión por LPS (Hunter *et al.*, 2009) o utilizar modelos genéticos que impliquen alteraciones de la actividad microglial como los ratones mutantes para LRRK2 (Choi *et al.*, 2015, Kumaran y Cookson, 2015). Precisamente, estas dos estrategias se investigarán en la presente Tesis Doctoral.

Cannabinoides antioxidantes para el tratamiento del daño oxidativo

Y para finalizar este apartado de Introducción, resaltaremos que muchos estudios farmacológicos en modelos experimentales de EP se han basado en el empleo de fitocannabinoides antioxidantes, dado que el estrés oxidativo es una característica importante en la patogénesis de la EP (Wang y Michaelis, 2010). Estos estudios han incluido la evaluación del Δ⁹-THC (Lastres-Becker *et al.*, 2005) y del CDB (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007) en ratas lesionadas con 6-OHDA, un modelo en el que la muerte de las neuronas dopaminérgicas se relaciona con la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo. También se ha visto neuroprotección a través del uso de cannabinoides sintéticos como el AM404, análogo de la AEA (García-Arencibia *et al.*, 2007), o el agonista de los receptores CB₁ y CB₂ CP55,940 (Jiménez-Del-Río *et al.*, 2008) pero su actuación no se debe a la activación o inhibición de los receptores cannabinoides, sino también a sus efectos antioxidantes. Como ya se ha mencionado antes, estos efectos serían debidos posiblemente a su estructura fenólica, lo que les proporciona capacidad antioxidante como lavadores de ROS, también se ha propuesto que involucren a ciertas señales intracelulares relacionadas con la actividad del factor de transcripción Nrf-2 (Juknat *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014).



OBJETIVOS



En la actualidad, aún no se ha encontrado remedio a la degeneración neuronal que se produce en la EP y los únicos tratamientos existentes están enfocados al alivio de síntomas. El Sistema Endocannabinoide está implicado en multitud de mecanismos de señalización y se postula como diana del tratamiento de la EP debido a los cambios que sufre durante el transcurso de las enfermedades neurodegenerativas y entre otros, por su papel regulador de la inflamación presente. En esta Tesis Doctoral hemos intentado caracterizar una diana terapéutica en la EP analizando diferentes parámetros del Sistema Endocannabinoide en modelos experimentales y en pacientes de la enfermedad. Además, hemos decidido abordar el tratamiento de la EP aplicando una estrategia polivalente mediante el uso de cannabinoides que posean capacidad para controlar los eventos inflamatorios proporcionando neuroprotección, a través de la activación de los receptores CB₂ o PPAR, y que alivien los síntomas mediante el bloqueo de los receptores CB₁. También sería interesante que tuviesen un perfil antioxidante y posean capacidad para disminuir la lesión oxidativa, actuando como lavadores de especies reactivas de oxígeno. Incluso se podría combinar estas moléculas con dosis de L-DOPA menos pro-disquinéticas para seguir conservando el efecto terapéutico de ésta, disminuyendo el riesgo de sufrir efectos secundarios.

Para conseguir cubrir todos los aspectos de esta terapia multifactorial, nos enfrentamos al proyecto desde los siguientes tres frentes:

Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson

La EP presenta importantes procesos inflamatorios que contribuyen a la muerte neuronal (Hirsch y Hunot, 2009) que podrían estar directamente relacionados con una regulación al alza del Sistema Endocannabinoide, y más concretamente del receptor CB₂, que debería ser visible en los pacientes y modelos animales de la enfermedad, especialmente cuando astrocitos y células microgliales se activan frente a estos procesos inflamatorios, excitotóxicos u oxidativos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Price *et al.*, 2009, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010). Esto ha sido estudiado en diferentes enfermedades neurodegenerativas que han situado al receptor CB₂ en una posición relevante para convertirse en diana farmacológica para el tratamiento de estas enfermedades por su potencial antiinflamatorio (Chiurciu *et al.*, 2015) y por su capacidad para controlar la activación glial (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010), incluyendo el suministro de sustratos metabólicos a las neuronas (Duarte *et al.*, 2012), la generación de neurotrofinas (Smith *et al.*, 2000, Molina-Holgado *et al.*, 2003), o la inhibición de la producción de quimioquinas por los astrocitos (Sheng *et al.*, 2009) y de citoquinas proinflamatorias por las células de microglía (Javed *et al.*, 2016).

En esta Tesis Doctoral, investigamos como primer objetivo si el receptor CB₂ se encontraba expresado en los ganglios basales de pacientes y de modelos animales de la EP, centrándonos en la sustancia *nigra*, principal estructura afectada en la enfermedad. En caso afirmativo, se identificarían los tipos celulares en los que está presente, y se realizaría un análisis cuantitativo de los posibles cambios que puedan producirse en la enfermedad.

Potencial neuroprotector de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

El receptor CB₂ se ha postulado como diana neuroprotectora debido a su regulación al alza en enfermedades neurodegenerativas (Ashton y Glass, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2007), a pesar de que este hecho ha sido poco estudiado en la EP.

Un cannabinoide capaz de activar el receptor CB₂ debería ser capaz de preservar las neuronas dopaminérgicas disminuyendo la producción de varios factores neurotóxicos, como TNF- α (Stella, 2010), por ejemplo. Los ensayos con agonistas del receptor CB₂ han dado buenos resultados en algunos modelos animales de la enfermedad (ratones lesionados con MPTP; Price *et al.*, 2009), pero no en otros (ratas lesionados con 6-OHDA; García-Arencibia *et al.*, 2007). Otros cannabinoides, como el CBD, han demostrado proteger a las neuronas nigrales por mecanismos independientes a los receptores CB₁ y CB₂, debido posiblemente al poder antioxidante que les confiere su estructura fenólica (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007).

Otros compuestos con potencial neuroprotector son los cannabinoides capaces de unirse y activar

los receptores nucleares de la familia de los PPAR que se expresan en microglía y astrocitos y regulan la activación microglial (Fidaleo *et al.*, 2014), protegiendo las neuronas dopaminérgicas, como se ha visto en el modelo de MPTP (Bright *et al.*, 2008).

Los antagonistas del receptor CB₁ pueden reducir la inhibición motora típica de la enfermedad (Fernández-Espejo *et al.*, 2005, González *et al.*, 2006, García-Arencibia *et al.*, 2009, Kelsey *et al.*, 2009) y además, carecen de los efectos psicotrópicos que producen los agonistas. Incluso se podría combinar un antagonista del receptor CB₁ con dosis de levodopa menos pro-disquinéticas y así seguir conservando el efecto terapéutico de ésta, disminuyendo el riesgo de sufrir disquinesia (Kelsey *et al.*, 2009).

En este contexto, el fitocannabinoides Δ^9 -THCV, por su perfil antagonista CB₁ (Bolognini *et al.*, 2010, Pezzoli y Zini, 2010), agonista CB₂ (Thomas *et al.*, 2005, Pertwee *et al.*, 2007, Bolognini *et al.*, 2010) y antioxidante podría ser un buen candidato farmacológico contra la EP.

Como segundo objetivo de esta Tesis Doctoral, analizamos si determinados cannabinoides con capacidad agonista CB₂ y/o antioxidantes y un cannabinoide sintético agonista PPAR γ poseen potencial neuroprotector. Además, evaluamos el efecto de determinados antagonistas CB₁ sobre los síntomas típicos de la enfermedad. Ambas estrategias abordadas en modelos animales de la EP. También evaluamos si Δ^9 -THCV es capaz de reducir la disquinesia asociada a levodopa en un modelo genético de EP.

Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con cannabinoides en el modelo LRRK2-G2019S

Siendo la mutación LRRK2-G2019S la causante más prevalente de EP autosómico dominante (Khan *et al.*, 2005), el modelo de ratones transgénicos con esta mutación desarrollado por Ramonet *et al.* (2011) parece un buen modelo de experimentación para analizar los cambios que puedan producirse en el Sistema Endocannabinoide durante la EP. Además, debido a la relación de la enzima LRRK2 con los procesos de respuesta inflamatoria, podría evaluarse la acción de cannabinoides agonistas CB₂ sobre estos procesos.

Así, el último objetivo de esta Tesis Doctoral consiste en estudiar el Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones del modelo genético de la EP de ratones transgénicos LRRK2-G2019S, y además, evaluar la acción de dos agonistas CB₂ sobre la progresión del fenotipo patológico en estos animales.

MATERIALES Y MÉTODOS



Diseños experimentales

Diseño I: Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson

Sujetos del estudio

En primer lugar se utilizaron muestras humanas *post mortem* de sustancia *nigra* de pacientes diagnosticados de EP y sujetos sanos usados como control. Estas muestras procedían de dos biobancos: “Fundación CIEN”, Madrid, España y “Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic, Barcelona, Catalunya”. Todas las muestras se obtuvieron tras la firma del consentimiento informado por los pacientes o familiares para la autopsia cerebral y el uso del tejido con fines científicos.

El tejido recibido tenía 3-5 µm de grosor, estaba fijado, parafinado y montado sobre portaobjetos de cristal. Se recibió una sección por cada paciente. Los biobancos también nos proporcionaron los historiales clínicos, por lo que se comprobó que los sujetos tenían una edad, género y tiempos adecuados de recogida de la muestra, y que no hubiesen sufrido eventos que pudiesen interferir en nuestro estudio, como enfermedades adicionales en el caso de los pacientes con EP o la causa de la muerte en el caso de los controles. Las características principales de los sujetos de estudio se recogen en la Tabla 2. Características principales de los donantes de tejido humano utilizado en este procedimiento..

Los datos neuropatológicos proporcionados por los biobancos confirmaban que todos los pacientes de EP exhibían una marcada atrofia de la sustancia *nigra* con evidencias de pérdida neuronal. También se consideró la medicación tomada por ambos grupos de sujetos como levodopa y agonistas dopaminérgicos en el caso de los pacientes con EP, para asegurar una homogeneidad muestral.

Sobre la sustancia *nigra* de estos pacientes se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para el estudio de la presencia del receptor CB₂ con un anticuerpo anti-receptor CB₂ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) que ya había sido probado anteriormente sobre tejido humano (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014), el marcador microglial IBA1 (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) y el marcador de macrófagos infiltrados y microglía activada CD68 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca).

Con el fin de identificar la población celular específica sobre la que se encontraba la tinción del receptor CB₂, se realizó un análisis con doble marcaje inmunofluorescente combinando el anticuerpo primario anti-receptor CB₂ con el anticuerpo primario anti IBA1 para marcar microglía o el anticuerpo primario anti-TH (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), para marcar neuronas dopaminérgicas.

Sujeto	Edad	Sexo	Diagnóstico	Tiempo post-mortem (min)	Biobanco
1	57	Mujer	Control	60	FCIEN
2	81	Hombre	Control	540	FCIEN
3	56	Hombre	Control	<480	FCIEN
4	66	Hombre	Control	420	HClínic
5	74	Mujer	Control	220	HClínic
6	82	Mujer	Parkinson	<480	FCIEN
7	75	Hombre	Parkinson	480	FCIEN
8	75	Hombre	Parkinson	<480	FCIEN
9	81	Hombre	Parkinson	330	HClínic
10	79	Mujer	Parkinson	210	HClínic

Tabla 2. Características principales de los donantes de tejido humano utilizado en este procedimiento.

Modelos animales utilizados en este diseño experimental

Con el fin de estudiar el papel del receptor CB₂ en modelos animales de EP se utilizaron tres tipos de lesiones estereotáticas unilaterales, que permiten usar las estructuras del lado no lesionado como control frente al lado lesionado en los diferentes análisis.

Se utilizaron ratones macho *wild-type* con un fondo genético C57BL/6J 3-4 meses de edad y 25-30 g de peso y se les sometió a la lesión intraestriatal con 6-OHDA (Alvarez-Fischer *et al.*, 2008), siendo sacrificados una semana después. Los animales cuyos cerebros se iban a someter a pruebas histológicas fueron perfundidos y a los animales cuyos cerebros se iban a someter a pruebas bioquímicas se les practicó una dislocación cervical. Se estudió la expresión del ARNm del receptor CB₂ en estriado y sustancia *nigra* mediante técnicas de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) e inmunohistoquímicas (Santa Cruz Biotechnology) en el estriado.

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley de una edad superior a 2 meses y un peso aproximado de 350 g, criadas y suministradas por Harlan (Harlan Laboratories, Indianapolis, USA). Se les practicó la lesión con 6-OHDA mediante la inyección en el tracto prosencefálico medial (m.f.b.; Sarre *et al.*, 2004) y dos semanas después, los animales fueron sacrificados por perfusión. Posteriormente, se realizó una detección inmunofluorescente del receptor CB₂ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y OX-42 (AbD Serotec, Oxford, UK), marcador de microglía activada, en la sustancia *nigra* de estos roedores.

Se utilizaron ratones macho homocigotos *knock-out* para el receptor cannabinoide de tipo 2 (CB₂^{-/-}) con un fondo genético C57BL/6J y sus correspondientes hermanos de camada *wild-type* (CB₂^{+/+}) de 3-4 meses de edad y 25-30 g de peso. Tras el donativo de la Dra. Nancy Buckley (California State Polytechnic University,

Pomona, California, USA)(Buckley *et al.*, 2000, Buckley, 2008), se comprobó el perfil genético de cada animal por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como se describe en Buckley *et al.* (2000) usando ADN extraído de una pequeña porción de tejido tomado de la oreja de cada animal. Fueron sometidos a una lesión intraestriatal con 6-OHDA (Alvarez-Fischer *et al.*, 2008), siendo sacrificados por perfusión una semana después. Se llevó a cabo una cuantificación inmunohistoquímica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* mediante inmunotinción con el anticuerpo anti-TH (Merck Millipore).

Otro grupo de ratones macho *wild-type* con un fondo genético C57BL/6J de 3-4 meses de edad y 25-30 g de peso se lesionó intraestriatalmente con LPS (Hunter *et al.*, 2009) y se sacrificaron dos semanas después. Los animales cuyos cerebros se iban a someter a pruebas histológicas fueron perfundidos y a los animales cuyos cerebros se iban a someter a pruebas bioquímicas se les practicó una dislocación cervical. Se estudió la expresión del ARNm del receptor CB₂ en estriado y sustancia *nigra* mediante técnicas de qRT-PCR e inmunohistoquímicas (Santa Cruz Biotechnology).

Para comprobar la implicación del receptor CB₂ en la supervivencia neuronal, se lesionaron intraestriatalmente con LPS (Hunter *et al.*, 2009) ratones macho homocigotos *knock-out* para este receptor (CB₂^{-/-}) y sus correspondientes hermanos de camada *wild-type* (CB₂^{+/+}) de 3-4 meses de edad y 25-30 g de peso. Se llevó a cabo una cuantificación inmunohistoquímica de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* mediante inmunotinción con el anticuerpo anti-TH (Merck Millipore) y se midió la respuesta inflamatoria mediante la inmunotinción de CD68, marcador de microglía y de infiltración de macrófagos periféricos (Herrera *et al.*, 2000), tanto en sustancia *nigra* como estriado.

Diseño II: Potencial terapéutico de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

Neuroprotección con cannabinoides por agonismo CB₂ y capacidad antioxidante

En primer lugar, se quiso evaluar el efecto neuroprotector/antiinflamatorio de la activación del receptor CB₂ usando Δ^9 -THCV o HU-308, por lo que se eligió el modelo de neuroinflamación con LPS. Se lesionaron ratones C57BL/6J macho adultos intraestriatalmente con la toxina LPS (Hunter *et al.*, 2009) y fueron tratados durante 14 días con Δ^9 -THCV (GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹, i.p.), el agonista selectivo del receptor CB₂ HU-308 (Tocris; 5 mg·kg⁻¹, i.p.) o vehículo (Tween 80:salino, 1:16). Al finalizar el tratamiento, parte de los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente se realizó el estudio de marcadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β , además de la iNOS mediante qRT-PCR. Otro grupo de estos ratones se sacrificó mediante perfusión para posteriormente cuantificar la supervivencia de las neuronas TH-positivas de la sustancia *nigra* (Merck Millipore) y estudiar el marcador microglial CD68 (Dako Cytomation) en estriado y sustancia *nigra* mediante inmunofluorescencia.

Para cerciorarnos de que los posibles efectos sobre los mecanismos antiinflamatorios de estos agonistas cannabinoides se realizan efectivamente a través del receptor CB₂, tratamos con el agonista selectivo del receptor CB₂ HU-308 (Tocris; 5 mg·kg⁻¹, i.p.) o vehículo (Tween 80:salino, 1:16) a ratones *knock-out* deficientes en el receptor CB₂, lesionados con LPS (Hunter *et al.*, 2009). Se evaluó la activación microglial mediante inmunofluorescencia de CD68 (Dako Cytomation).

También se determinó la capacidad neuroprotectora de Δ^9 -THCV en el modelo de ratas lesionadas con 6-OHDA administrado de manera i.c.v. (Rodríguez Díaz *et al.*, 2001), que produce un daño bilateral y tratadas diariamente durante 14 días con Δ^9 -THCV

(proporcionado por GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹, i.p.), extracto botánico enriquecido en CBD (CBD-BDS) utilizado como control positivo (GW Pharmaceuticals; contiene 64.8% de CBD, 2.3% de Δ^9 -THC, 1.1% de cannabigerol, 3.0% de cannabicromeno, y 1.5% de otros fitocannabinoides) a una dosis de 4.63 mg·kg⁻¹ [equivalente a 3 mg·kg⁻¹ de CBD puro, la misma dosis usada en anteriores estudios de neuroprotección (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007)] o vehículo (Tween 80:salino, 1:16, i.p.). Dos horas después de la última inyección, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se evaluó la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mediante inmunofluorescencia para TH (Merck Millipore) y el estado de la microglía con el marcaje anti-OX-42 (AbD Serotec) en la sustancia *nigra*.

Neuroprotección con derivados cannabinoides con actividad sobre PPAR γ

Para el desarrollo de este objetivo se trabajó con el compuesto 6-(3,7-dimetil-octa-2,6-dienil)-5-hidroxi-3-pentil-2-etilamino-[1,4]benzoquinona [VCE-003.2; quinona de segunda generación; EP1415954 (Appendino *et al.*, 2015)], derivado semi-sintético del cannabigerol (CBG) que parece actuar modulando la vía PPAR γ y que ya ha demostrado ser neuroprotector en otras enfermedades neurodegenerativas (Díaz-Alonso *et al.*, 2016). Este experimento pudo llevarse a cabo gracias a una colaboración con VivaCell Biotechnology España S.L. (Córdoba, España), una compañía privada dedicada al desarrollo de fármacos en fase pre-clínica, centrada en nuevos derivados semi-sintéticos cannabinoides no-psicotrópicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas.

Se evaluó el efecto del compuesto VCE-003.2 sobre los síntomas motores de la enfermedad, la

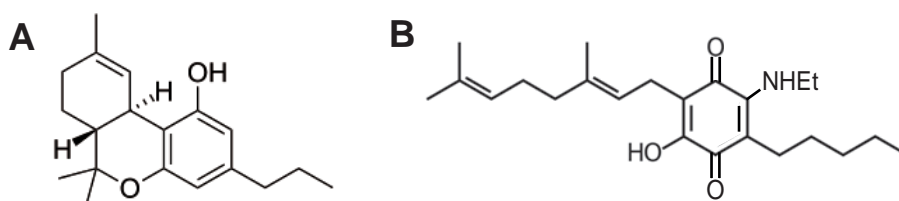


Figura 15. Estructuras químicas del Δ^9 -THCV (A) y VCE-003.2 (B)

supervivencia neuronal y la activación microglial. Se utilizaron ratones macho C57BL/6J de 3-4 meses de edad y un peso de 25-30 g, estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina tras el suministro por Charles River (Charles River Laboratories Internacional Inc. Erkrath, Germany). Estos ratones fueron lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA (Alvarez-Fischer *et al.*, 2008) y recibieron una inyección i.p. diaria de VCE-003.2 (10 mg·kg⁻¹) o vehículo (DMSO 1%:Tween 80 6,25%:BSA 2%). El séptimo día de tratamiento, los ratones se sometieron a las pruebas motoras del rotarod y actímetro para ser sacrificados posteriormente por dislocación cervical. Después, se efectuó un estudio de la supervivencia de neuronas TH-positivas (Merck Millipore) y del marcador de actividad glial CD68 (AbD Serotec) en la sustancia *nigra* de estos roedores mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Efecto de antagonistas CB₁ sobre algunos síntomas de la Enfermedad de Parkinson

El hecho de que uno de los cannabinoides evaluado, el Δ^9 -THCV, también tenga actividad como antagonista CB₁ ha permitido desarrollar el análisis de sus efectos sintomáticos sobre la inhibición motora. Para ello primero se realizaron una serie de estudios para confirmar la actividad de Δ^9 -THCV como antagonista del receptor CB₁, usando dos pruebas comportamentales relacionadas con la tétrada cannabinoide, la medición de la actividad motora en el actímetro y el *test* de la placa caliente para medir analgesia. En estudios anteriores de Pertwee *et al.* (2007) y Bolognini *et al.* (2010) la dosis de 2 mg·kg⁻¹ actuaba como antagonista del receptor CB₁ cuando se administraba a ratones. Por lo que esta dosis se utilizó para revertir el efecto analgésico e hipoquinético del agonista cannabinoide CP 55,940 (Tocris Bioscience, Biogen Científica, Madrid, España) a la dosis de 0.1 mg·kg⁻¹ i.p. en ratas naïve adultas de la cepa Sprague Dawley. El análisis de la actividad motora en el actímetro se realizó 10 minutos después de la administración, y fue seguido del *test* de la placa caliente.

Una vez confirmada la actividad antagonista de Δ^9 -THCV, la dosis de 2 mg·kg⁻¹ se utilizó en un grupo de ratas lesionadas de manera i.c.v. con 6-OHDA (Rodríguez Díaz *et al.*, 2001) con objeto de evaluar el efecto del Δ^9 -THCV sobre la inhibición motora en este modelo de EP.

Catorce días después de la lesión, las ratas recibieron una única dosis i.p. de Δ^9 -THCV (GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹), rimonabant (proporcionado por Sanofi-Aventis, Montpellier, France; 0.1 mg·kg⁻¹) o vehículo (Tween 80:salino, 1:16). Se eligió esta dosis de rimonabant por estudios anteriores y se utilizó en este caso como control positivo (González *et al.*, 2006, García-Arencibia *et al.*, 2008). Diez minutos después de la inyección, se analizó el comportamiento motor en un actímetro informatizado y seguidamente después los animales fueron sacrificados por decapitación. Tras la extracción y disección de los ganglios basales, los tejidos se congelaron a -80°C hasta el análisis del contenido en DA y glutamato mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o un kit comercial (BioVision, Mountain View, CA, USA), respectivamente.

Efecto de Δ^9 -THCV sobre la disquinesia asociada a levodopa en el modelo de ratones *aphakia*

A la capacidad del Δ^9 -THCV de actuar como neuroprotector mediante agonismo CB₂ y capacidad antioxidante, y de reducir la inhibición motora en la EP mediante su actividad antagonista CB₁, se quiso estudiar un posible efecto de este fitocannabinoide en combinación con L-DOPA en un modelo animal de disquinesia. El objetivo era conseguir una mejora de los síntomas de la EP, junto con una disminución o retraso en la aparición de la disquinesia, que pudiera permitir desarrollar una terapia combinada con dosis menos pro-disquinéticas de L-DOPA como se ha propuesto en algún estudio previo (Kelsey *et al.*, 2009).

El accésit otorgado a nuestro trabajo con el Δ^9 -THCV sobre la inhibición motora en el IX Certamen Arquímedes de Introducción a la Investigación Científica nos permitió realizar una colaboración con el laboratorio de la Dra. Rosario Moratalla del Instituto Cajal (CSIC) de Madrid, enfocada a averiguar si el Δ^9 -THCV *per se* provoca disquinesia a la dosis de 2 mg·kg⁻¹, valorar el efecto de su combinación con L-DOPA sobre los síntomas de la enfermedad y estudiar si es capaz de retrasar la aparición de los síntomas de disquinesia o revertirlos una vez establecidos.

Para llevar a cabo estos objetivos, se eligió el modelo experimental de parkinsonismo genético de ratones *aphakia*, que son deficientes para la proteína PITX3, factor de transcripción implicado

en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc (Hwang *et al.*, 2003). Estos ratones *Pitx3*^{-/-} representan una buena herramienta para el estudio de la EP y más concretamente de la disquinesia, tanto reproduciendo los cambios bioquímicos inducidos por el tratamiento crónico con L-DOPA (Ding *et al.*, 2007), como desde el punto de vista comportamental, dado que es uno de los pocos modelos genéticos que desarrolla este efecto secundario tras la administración de levodopa (Shan *et al.*, 2015).

Se utilizaron ratones adultos de 4-6 meses de edad y un peso de 24-30 g al comienzo del estudio, homocigotos *knock-out* para *Pitx3* (*Pitx3*^{-/-}) estabulados en el animalario del Instituto Cajal. El genotipo de cada ratón fue comprobado por el método de la PCR usando ADN extraído de una porción de tejido tomado de la cola de cada animal.

Con el fin de estudiar posibles cambios en el Sistema Endocannabinoide de los ratones *aphakia*, un grupo de ratones adultos (*wild-type* y *Pitx3*^{-/-}) fueron sacrificados por decapitación para utilizar sus cerebros en el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de varios componentes del Sistema Endocannabinoide como son los receptores CB₁ y CB₂, y las enzimas de degradación de endocannabinoides FAAH y MAGL.

Para desarrollar los síntomas de disquinesia, se administró a los ratones adultos *Pitx3*^{-/-} una inyección i.p. diaria de L-DOPA metil-éster

(Sigma-Aldrich, Madrid, España; 10 mg·kg⁻¹) durante 14 días. Para inhibir la descarboxilasa periférica y aumentar la concentración de L-DOPA que llega al cerebro, se administró benserazida (Sigma-Aldrich; 10 mg/kg, i.p.) 20 minutos antes de L-DOPA (Ding *et al.*, 2007, Giorgi *et al.*, 2008, Padovan-Neto *et al.*, 2009, Lorenc-Koci *et al.*, 2013). El Δ^9 -THCV (GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹) o el vehículo fueron inyectados i.p., también diariamente, 10 minutos después de la administración de la L-DOPA. Para determinar si el Δ^9 -THCV disminuía los síntomas de la disquinesia una vez que ésta ya estaba establecida, a la mitad de los ratones del grupo que recibía únicamente L-DOPA se les administró el último día de tratamiento una única dosis de Δ^9 -THCV y ver su efecto agudo.

Durante el tiempo que duró el tratamiento crónico, se evaluó la aparición y progresión de la disquinesia mediante pruebas comportamentales que consistían en cuantificar los movimientos anormales involuntarios (AIM) y estudiar la coordinación, equilibrio y actividad motora horizontal y vertical. Los ratones fueron sacrificados 1 hora después de la última inyección de L-DOPA mediante perfusión. Sobre las secciones correspondientes al estriado de estos ratones se emplearon técnicas inmunohistoquímicas para la detección de dos marcadores que están relacionados con la aparición de disquinesia, la proteína FosB (Santa Cruz Biotechnology; Pavón *et al.*, 2006) y la histona H3 fosfoacetilada (Merck Millipore; Darmopil *et al.*, 2009).

Diseño III: Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con agonistas CB₂ en el modelo *LRRK2-G2019S*

En el último objetivo de esta Tesis Doctoral y gracias a financiación por parte de la Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (New York, USA) nos propusimos trabajar con un modelo genético de la EP, ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* para estudiar el Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de estos ratones, y además, evaluar la acción neuroprotectora de dos agonistas CB₂ en estos ratones.

Este modelo fue desarrollado por el equipo del Dr. Darren Moore (Ramonet *et al.*, 2011) y consiste en ratones transgénicos que expresan el gen *LRRK2* humano (*locus PARK8*) con la mutación G2019S expresada exclusivamente en neuronas, estando presente en las neuronas dopaminérgicas de la SN. En general estos ratones son viables, fértiles y sin unas diferencias reseñables en cuanto a comportamiento o supervivencia respecto a sus hermanos no transgénicos, tratándose *a priori* de una buena herramienta para el estudio de la EP dado que presenta pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* a una edad superior a los 18 meses y ciertos cambios comportamentales compatibles con los síntomas parquinsonianos (Ramonet *et al.*, 2011).

Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho adultos [B6;C3-Tg(EPGFB-*LRRK2**G2019S)340Djmo/J] y sus hermanos de camada *wild-type*, suministrados por Jackson Laboratories (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) cuando tenían 3-4 meses de edad y fueron estabulados en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid.

Caracterización neurológica y neuropatológica de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

En un primer experimento dirigido a estudiar la evolución del perfil patológico de este modelo genético, se utilizaron ratones macho transgénicos y no-transgénicos. Mensualmente, desde los 6 hasta los 18 meses de edad,

los animales fueron pesados y sometidos a diferentes *tests* comportamentales (actímetro, rotarod, *pole test* y *hanging-wire test*).

Basándonos en los datos descritos por Ramonet *et al.* (2011), que situaban la aparición del déficit motor en el intervalo de los 12-18 meses y la pérdida neuronal en los ganglios basales a los 19 meses de edad, grupos de ratones fueron sacrificados a los 6, 12 y 18 meses de edad para evaluar, desde el punto de vista bioquímico, la progresión de la enfermedad en cuanto a pérdida de neuronas TH-positivas y aparición de gliosis reactiva, así como los cambios en el Sistema Endocannabinoide. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y al extraer los cerebros, uno de los hemisferios fue congelado y el otro hemisferio fue fijado *post mortem*.

El hemiserebro congelado sin fijar se destinó al análisis por qRT-PCR de varios componentes del Sistema Endocannabinoide como son el receptor CB₂, y las enzimas de degradación de cannabinoides FAAH y MAGL, en sustancia *nigra*, globo pálido y cuerpo estriado. También se analizaron algunos marcadores inflamatorios como TNF- α y COX-2, así como la enzima aldehído deshidrogenasa 1A1 (Aldh1A1) por su valor como marcador temprano de la EP, todos ellos en sustancia *nigra*.

El hemiserebro fijado se destinó a la realización de pruebas inmunohistoquímicas. Para cuantificar el número de neuronas viables, se realizó una tinción de azul de metileno en la sustancia *nigra*. Se cuantificó la densidad de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* mediante el uso del anticuerpo anti-TH (Merck Millipore). Se llevó a cabo un estudio de la activación microglial en estriado y sustancia *nigra* mediante el anticuerpo anti-IBA1 (Wako Chemicals). También se realizó un estudio del marcador de autofagia LAMP-1 (DSHB) en estriado y sustancia *nigra*, y la cuantificación de las neuronas de Purkinje presentes en cerebelo mediante el uso del anticuerpo anti-calbindina (Merck Millipore).

El receptor CB₂ como diana del tratamiento de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

Con el fin de evaluar el efecto de dos agonistas del receptor CB₂ sobre el desarrollo de la enfermedad en este modelo, se realizó un segundo experimento en el cual ratones macho transgénicos y no-transgénicos se sometían a estudios farmacológicos a partir de los 12 y hasta los 18 meses de edad. Los tratamientos farmacológicos consistían en una inyección diaria i.p. de los agonistas del receptor CB₂ HU-308 (Tocris Bioscience; 5 mg·kg⁻¹; Hanus *et al.*, 1999) y Δ⁹-THCV (GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹; Bolognini *et al.*, 2010), en unos grupos de forma individual y en otros grupos en combinación con el antagonista selectivo del receptor CB₂ SR 144528 (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA; 1 mg·kg⁻¹; Rinaldi-Carmona *et al.*, 1998), o vehículo (Tween80:salino, 1:16), que se administraban 10 minutos antes que los agonistas.

Se eligieron estas dosis por haber sido efectivas en la activación/bloqueo del receptor CB₂ cuando se administraban a modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas llevados a

cabo previamente por este y otros laboratorios (Capasso *et al.*, 2001, Comelli *et al.*, 2007).

Cada 2 meses, los ratones se sometieron a estudios neurológicos mediante las mismas pruebas de comportamiento que se llevaron a cabo para la caracterización de estos animales (siempre llevados a cabo 24 horas después de la última inyección para descartar posibles efectos agudos sobre la respuesta comportamental), siendo sacrificados al alcanzar los 18 meses de edad y los 6 meses de tratamiento crónico.

Al igual que en el experimento anterior, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y uno de los hemiserebros fue congelado y el otro fue fijado *post mortem*.

Las sustancias *nigras* de los hemiserebros congelados sin perfundir se utilizaron para el análisis por qRT-PCR de los marcadores TNF-α, COX-2 y ALDH1A1. A partir de los hemiserebros fijados *post mortem* se realizaron análisis de supervivencia neuronal, activación glial y autofagia mediante tinción de azul de metileno e inmunohistoquímica para TH (Merck Millipore) en sustancia *nigra*, IBA1 (Wako Chemicals) en sustancia *nigra* y estriado, y LAMP-1 (DSHB) en sustancia *nigra* y estriado, respectivamente.

Métodos experimentales

Animales de experimentación

Los animales de experimentación se mantuvieron siempre estabulados bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($55 \pm 10\%$), con un fotoperíodo estable de 12 horas (8:00 – 20:00) y acceso *ad libitum* a comida estándar y agua.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo las normativas europea y española para el correcto manejo de animales utilizados para fines científicos (Directiva Europea 2010/63/EU y Real Decreto 53/2013) y de acuerdo con las normas aprobadas por el comité ético de los órganos competentes; la Universidad Complutense de Madrid (código 127/2012) o el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y la Comunidad Autónoma de Madrid en cada caso.

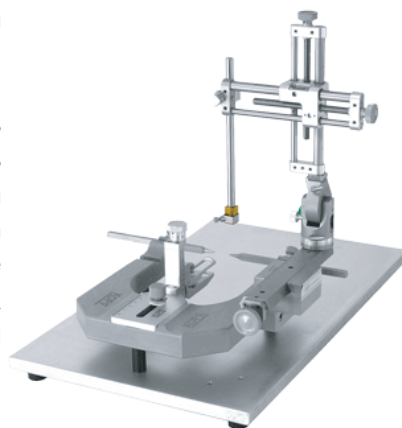
Lesiones estereotáxicas

Durante la ejecución del presente trabajo, se utilizaron cuatro modelos distintos de lesiones estereotáxicas con el fin de reproducir los eventos fisiopatológicos que intervienen en la EP.

Lesión 6-OHDA en el m.f.b. sobre ratas

Cuando se inyecta 6-OHDA en el m.f.b. de ratas Sprague Dawley, primero se produce degeneración de los terminales estriales y posteriormente, la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Sarre *et al.*, 2004). Se produce un daño unilateral en la SNpc. Debido a que la toxina produce una degeneración selectiva de las neuronas catecolaminérgicas, 30 minutos antes de la lesión las ratas recibieron una inyección de desipramina (Sigma-Aldrich; $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.), inhibidor de la recaptación de noradrenalina, para proteger las neuronas noradrenérgicas y centrar la lesión sobre las dopaminérgicas (Breese y Traylor, 1971). Los animales son anestesiados con una preparación de ketamina (Imalgene; Merial, Barcelona, Catalunya; $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) + xilacina (Rompun, Bayer, Barcelona, Catalunya; $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) y colocados en un aparato estereotáxico David Kopf 900 (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Mediante el uso de una jeringuilla Hamilton de $10 \mu\text{L}$ (Hamilton, Bonaduz, Switzerland), los animales reciben una inyección estereotáxica de 6-OHDA ($8 \mu\text{g}$ en un

volumen de $2 \mu\text{L}$ de solución salina con 0.05% de ascorbato sódico para evitar la oxidación; Sigma-Aldrich) o de solución salina (para las ratas control) en el m.f.b., en las siguientes coordenadas desde el bregma: -2.5 mm AP , -1.8 mm ML and -8.9 mm DV , de acuerdo con Paxinos y Watson (1986). La solución se inyecta lentamente con un flujo de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ y la aguja se mantiene 5 minutos en ese lugar antes de ser retirada lentamente para facilitar la difusión de la toxina y evitar la generación de reflujo y el aumento de la presión intracraneal. Tras la inyección, la herida es suturada y los animales son colocados en un jaula limpia sobre una almohadilla térmica hasta su total recuperación de la anestesia.



Lesión con 6-OHDA intraestriatal en ratones

En el caso de los ratones, la 6-OHDA se libera unilateralmente dentro del estriado, induciendo un daño lento, progresivo y parcial de la vía nigroestriatal de manera retrógrada que tiene lugar durante un período de hasta 3 semanas (Sauer y Oertel, 1994, Przedborski *et al.*, 1995). Aquí el daño es más progresivo y menos extendido, más parecido al ocurrido durante el proceso patológico de la enfermedad. También reproduce los síntomas no motores de la EP, incluidas las alteraciones a nivel cognitivo y gastrointestinal (Branchi *et al.*, 2008) y la facilidad para inyectar estereotáxicamente en una estructura grande como el estriado permite una mayor precisión de la lesión y mayor tasa de supervivencia de los animales operados (Blandini *et al.*, 2008, Bagga *et al.*, 2015). Los animales (también pre-tratados con desipramina $25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. antes de la anestesia) reciben una inyección unilateral de 6-OHDA ($4 \mu\text{g}$ en un volumen de $2 \mu\text{L}$ de solución salina con 0,2% de ascorbato sódico) o de solución salina, en el estriado derecho con un flujo de $1 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, en las siguientes coordenadas desde el bregma: $+0.4 \text{ mm AP}$, -1.8 mm ML y -3.5 mm DV , como se describe en Alvarez-Fischer *et al.* (2008).

Lesión con 6-OHDA i.c.v. en ratas

Para generar modelos de daño bilateral en ratas, la lesión es aquella en la que la inyección de la 6-OHDA (200 µg en un volumen de 5 µL de solución salina con 0.05% de ascorbato sódico; flujo 1 µL·min⁻¹; Sigma-Aldrich) se realiza por vía i.c.v., en el interior del tercer ventrículo en las siguientes coordenadas desde el bregma: -2 mm AP, 0 mm ML y 8 mm DV, de acuerdo con Paxinos y Watson (1986), según el procedimiento descrito anteriormente por Rodríguez Díaz *et al.* (2001). Esta lesión produce una depleción dopaminérgica en ambos lados del cerebro, reproduciendo los síntomas motores de manera bilateral. También afecta a poblaciones de neuronas dopaminérgicas diferentes a las nigroestriales, pero siempre en menor medida y de forma compatible con el estudio de la lesión en los ganglios basales (González *et al.*, 2006).

Lesión con LPS intraestriatal en ratones

Cuando queremos obtener una lesión basada en eventos inflamatorios, la toxina elegida es el lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterica* serotipo Minnesota (Sigma-Aldrich), que produce activación microglial y pérdida sostenida de neuronas dopaminérgicas (Iravani *et al.*, 2005). Los ratones reciben dos inyecciones unilaterales en el estriado derecho en las siguientes coordenadas desde el bregma: +1.18 mm AP, -1.5 mm ML, -3.5 mm DV, y -0.34 mm AP, -2.5 mm ML, -3.2 mm DV, como se describe en Hunter *et al.* (2009). En cada coordenada se inyectan 5 µg de LPS en un volumen de 1 µL de solución salina con un flujo de 1 µL·min⁻¹, o solución salina en el caso de los ratones control, siguiendo el mismo procedimiento quirúrgico que para la 6-OHDA.

En los modelos con inyección unilateral (modelo hemiparinsoniano), tanto con 6-OHDA como con LPS, podemos utilizar el hemisferio no-lesionado a modo de control interno y presentar los datos como porcentaje en el lado lesionado (ipsilateral) respecto al no-lesionado (contralateral).

Preparación de los cannabinoides

Debido a la elevada hidrofobicidad de los cannabinoides, para su disolución en medio acuoso para ser inyectado con mayor facilidad y precisión, es necesario disminuir la tensión superficial del agua o suero salino mediante el uso de detergentes como Tween 80 (Sigma-Aldrich). La solución inyectable se prepara a

partir de los cannabinoides disueltos en etanol puro (o DMSO 1%:etanol puro en el caso de VCE-003.2), que se mezclan con la cantidad necesaria de Tween 80 y se gasean con nitrógeno hasta la total evaporación del etanol. Finalmente se disuelven con el suero salino (o PBS con BSA al 2% en el caso de VCE-003.2) en la proporción 1:16. De esta manera, los grupos denominados *vehículo* y *sham* reciben un tratamiento con una mezcla de Tween 80:salino (1:16) o DMSO:Tween 80:BSA cuando corresponda.

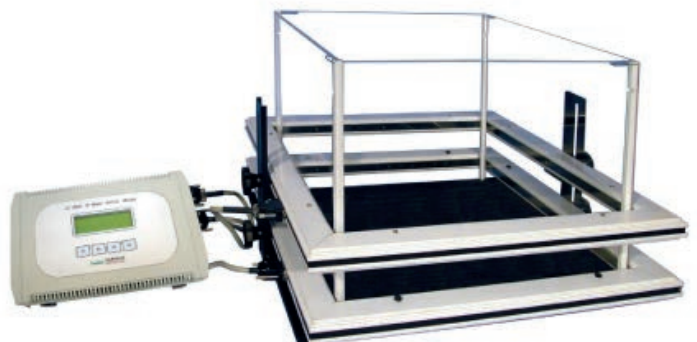
Pruebas comportamentales

El comportamiento motor de las ratas y ratones involucrados en los experimentos relatados anteriormente fue evaluado con las siguientes pruebas comportamentales:

Actividad horizontal y vertical:

La actividad motora se registró durante la fase de luz en un actímetro informatizado Actitrack (Panlab) que consiste en un área de 45 x 45 cm, con una fila de sensores infrarrojos alrededor de todo el perímetro espaciados 2.5 cm para medir la actividad horizontal a ras de suelo, y otra fila de sensores exactamente igual ubicada a 4 cm de altura de la primera para medir la actividad vertical (Gould *et al.*, 2009). Todo ello acoplado a un controlador informático que analiza los siguientes parámetros:

- Distancia recorrida (Ambulación)
- Velocidades media y máxima desarrolladas durante el recorrido de esta distancia
- Tiempo empleado en movimientos rápidos (>5 cm/s) y lentos (<5 cm/s)
- Tiempo de inactividad
- Frecuencia con la que el animal se levanta sobre sus patas traseras o *rearings*



Los animales permanecieron durante 10 min en el actímetro. Se analizaron los datos obtenidos en los 5 últimos minutos mientras que los 5 primeros minutos se emplean en la adaptación del animal al aparato con el objetivo de reducir la influencia del estrés en las mediciones.

En el experimento de disquinesia realizado en el Instituto Cajal (CSIC) y durante los días pares de tratamiento, se midió la actividad motora en cajas de actividad (AccuScan Instruments Inc.) con un tamaño de 20 x 20 cm durante un periodo de 30 minutos empezando 60 minutos después de la administración de L-DOPA. El software acoplado a este aparato contabiliza el número de veces que el animal interfiere con los haces infrarrojos horizontales y verticales.

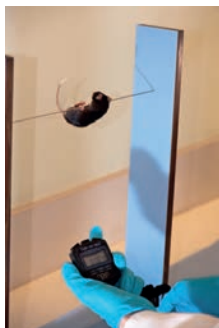
Test de la placa caliente:

Para el estudio de la analgesia utilizamos un *test* de dolor agudo que implica a las áreas supraespinales, como el de la placa caliente, que consiste en colocar a las ratas individualmente en una superficie a 52°C y medir el tiempo que tarda cada animal en exhibir el primero de los siguientes signos de dolor: lamerse las patas, o levantarlas rápida y repetidamente. Los animales que no respondían tras 30 segundos fueron retirados para evitar daño en los tejidos (Crawley, 1999).



Test de la percha o *hanging-wire test*:

En este *test* se evalúa la fuerza muscular de los animales. Consiste en contabilizar el tiempo que el ratón permanece sujeto a un cable de acero por las patas delanteras, situado a 30 centímetros de altura. Se mide el tiempo que el animal tarda en caer, siendo el tiempo máximo de permanencia de 180 segundos por sesión (Del Bel *et al.*, 2002).



Test del Rotarod:

En este *test* se evalúa principalmente la coordinación motora asociada a la actividad de los ganglios basales y cerebelo (Monville *et al.*,

2006). El aparato (Panlab/Harvard Apparatus) consiste en un cilindro que puede girar a velocidad constante o con aceleración. El ratón se coloca orientado en contra del sentido de giro.

Fase de entrenamiento: Un día antes de la primera recogida de datos de comportamiento, se lleva a cabo la sesión de entrenamiento, durante la cual los ratones son colocados en el rotarod a una velocidad constante de 4 r.p.m., si éstos se caen se vuelven a colocar (un máximo de 3 veces por serie) hasta que los ratones consiguen mantenerse en el cilindro 30 segundos seguidos. Los ratones tienen un tiempo mínimo de descanso de 5 minutos entre series.



Fase de recogida de datos: Se contabiliza el tiempo que el animal tarda en caerse del cilindro, esta vez la velocidad aumenta gradualmente desde las 4 r.p.m. hasta 40 r.p.m. en un tiempo total de 5 minutos. Se recogen tres medidas para cada ratón. La primera medida se desecha por ser la que más variabilidad tiene con respecto a las dos siguientes, de las que se obtiene el valor medio para cada ratón.

En el experimento de disquinesia llevado a cabo en el Instituto Cajal (CSIC), también se utilizó el *test* de rotarod (UgoBasile, Roma, Italia) siguiendo un esquema específico desarrollado por González-Aparicio y Moratalla (2014) para evaluar la coordinación motora y el equilibrio. Todos los animales se habituaron al aparato antes de las sesiones de recogida de datos, se les situó encima del cilindro inmóvil durante un minuto, si se caían, se les volvía a colocar encima. Se midió el tiempo que los ratones permanecían en el rotarod mientras éste giraba a una velocidad constante de 10 r.p.m. durante un máximo de 3 minutos. Los animales se evaluaron a los 60 minutos después del tratamiento con L-DOPA (cuando el máximo de actividad disquinética decae).

Test del mástil o *pole test*:

Este *test* evalúa la bradiquinesia o reducción del movimiento del ratón. Consiste en colocar al animal en el extremo superior vertical de una varilla de unos



50 cm de longitud y 1 cm de diámetro cubierta por un material rugoso y contabilizar el tiempo que el ratón tarda en descenderla (Ogawa *et al.*, 1985, Matsuura *et al.*, 1997).

Análisis de los movimientos anormales involuntarios (AIM):

Esta prueba se utiliza para determinar el grado de disquinesia inducida por el tratamiento crónico con L-DOPA en los ratones. Consiste principalmente en el análisis de los movimientos anormales estereotipados de las patas, siguiendo el procedimiento descrito por Ding *et al.* (2007). Los ratones bajo los efectos del fármaco se sitúan en las paredes de la jaula y realizan saltos repetidos sobre las patas traseras o incluso apoyan el peso de su cuerpo sobre la cola mientras mueven las patas delanteras repetidamente arriba y abajo.

En los días impares de tratamiento, los ratones fueron colocados en jaulas individuales y su comportamiento fue grabado en vídeo durante 4 minutos una vez transcurridos 30 y 60 minutos de la administración de L-DOPA, que es cuando se alcanza la máxima intensidad de estos movimientos involuntarios (Pavón *et al.*, 2006, Ruiz-DeDiego *et al.*, 2015, Solís *et al.*, 2015). El día 14, se evaluó el comportamiento de los ratones cada 20 minutos durante los 160 minutos posteriores a la inyección con L-DOPA. Posteriormente se visualizaron los vídeos y se analizaron los datos siguiendo un procedimiento de doble ciego. Se contabilizó el tiempo que el ratón permanecía saltando sobre una sola pata trasera o se apoyaba en la cola y la suma total de estos tiempos es el valor de duración de la disquinesia para cada ratón (Solís *et al.*, 2015).

Técnicas histológicas

Preparación del tejido

Cuando el tejido iba a ser empleado solamente en estudios histológicos, los animales fueron sacrificados mediante perfusión. Para llevar a cabo este procedimiento, se administró al roedor una sobredosis de anestesia [ketamina (Merial):xilacina (Bayer), 3:1, i.p.], después se inyectaron por vía intracardiaca 10 mL de suero salino para eliminar la sangre, seguido de 100 mL de paraformaldehído frío al 4% en PBS para fijar los tejidos. Los cerebros fueron extraídos rápida y cuidadosamente, sumergidos 24 horas en paraformaldehído en PBS al 4°C para post-

fijar, y posteriormente sumergidos en sacarosa al 30% en PBS para crioprotegerlos. Finalmente, se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -80°C hasta la obtención de secciones coronales de 30 µm de grosor con la ayuda de un criostato Leica CM3050S (Leica, Wetzlar, Germany).

En caso de realizarse pruebas bioquímicas, los roedores eran sacrificados por decapitación o dislocación cervical y los cerebros se extraían de manera rápida y cuidadosa y se congelaban en isopentano frío y se conservaban a -80°C hasta la realización del análisis. Cuando el tejido de estos mismos animales también debía utilizarse en análisis histológicos, el cerebro (total o parcial) se fijaba de manera *post mortem* mediante inmersión en paraformaldehído, seguido de crioprotección con sacarosa al 30% en PBS y se congelaba hasta la obtención de las secciones.

Tinción de azul de Metileno

Con el fin de cuantificar el número de neuronas viables, se realizó una tinción de azul de metileno, un colorante básico que tiñe los núcleos, y en menor medida el citoplasma, de las células, en las secciones correspondientes a la sustancia *nigra*. Los cortes se incubaron con una solución al 0.1% de cloruro de metiltioninio (azul de metileno) durante 5 minutos y se lavaron con agua destilada. Las muestras fueron deshidratadas por inmersión en alcoholes de graduación creciente, aclaradas con xilol y cubiertas con cubreobjetos de cristal con medio de montaje no acuoso (DEPEX).

Técnicas inmunohistoquímicas

Para la realización de las técnicas histológicas sobre tejido humano se siguió el protocolo descrito previamente por Hisano *et al.* (1996) y Benito *et al.* (2005), por el cual las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas por inmersión en orden sucesivo en xilol, etanol 100°, etanol 96°, etanol 70° y agua destilada. Después, se lavaron con tampón fosfato potásico (KPBS) 50 mM, pH 7.4. Para obtener una inmunotinción más eficiente, se desenmascaró el antígeno mediante calentamiento en microondas en solución tampón citrato comercial a pH 6 (Dako Cytomation). Sobre las muestras animales no es necesaria la desparafinación ni el desenmascaramiento antigénico, ya que las secciones provenían de muestras congeladas y se obtuvieron mediante el corte en criostato.

Para la realización de la inmunotinción propiamente dicha, el tejido se lavó varias veces con KPBS y posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena con solución de bloqueo comercial (Dako Cytomation) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados con KPBS, los tejidos se incubaron toda la noche a 4°C con alguno de los siguientes anticuerpos primarios:

- monoclonal de ratón anti-receptor CB₂ (R&D systems, Minneapolis, MN, USA, diluido 1:100)
- policlonal de cabra anti-receptor CB₂ (Santa Cruz Biotechnology; dilución 1/500)
- monoclonal de rata anti-CD68 (AbD Serotec; dilución 1/200)
- policlonal de conejo anti-FosB (Santa Cruz Biotechnology; 1:7500)
- policlonal de conejo anti-Histona 3 fosfo-(Ser10)-acetil(Lys14; pAch3; Merck Millipore; 1:1500)
- policlonal de conejo anti-TH (Merck Millipore; dilución 1/500)
- policlonal de conejo anti-IBA1 (Wako Chemicals; dilución 1/300)
- policlonal de conejo anti-calbindina (Merck Millipore; dilución 1/250)
- monoclonal de rata anti-LAMP-1 [depositado por el Dr. J. Thomas en Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB); Hybridoma Product 1D4B; creado por NICHD (NIH) y mantenido por The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA]

todos diluidos en KPBS conteniendo suero normal de caballo al 5% y Triton X-100 al 0.1% (Sigma-Aldrich). Al día siguiente, las secciones se lavaron con KPBS, se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Vector Elite; dilución 1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución similar a la del anticuerpo primario. Para conseguir un producto visible de la reacción se utilizó el complejo avidina-biotina (Vector Elite) para amplificar la señal y el sistema sustrato-cromógeno de DAB (Dako Cytomation) para el revelado, todo ello siguiendo las instrucciones de los fabricantes. En el caso de la inmunohistoquímica para FosB, ésta se reveló con DAB-níquel, añadiendo sulfato amónico de níquel al 0.05% a la solución de DAB y H₂O₂ para

intensificar el color (Armengol Butrón de Mújica y Miñano Sánchez, 1995).

Los controles negativos se obtuvieron realizando el mismo procedimiento en secciones similares pero omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo anti-receptor CB₂ de R&D systems utilizado en las muestras humanas *post mortem*, se llevó a cabo otro control negativo usando un péptido de bloqueo inmunogénico dirigido contra la zona N-terminal del receptor CB₂, siguiendo el procedimiento utilizado en Rodríguez-Cueto *et al.* (2014).

Finalmente, las secciones fueron deshidratadas en gradiente alcohólico creciente, aclaradas con xilol y cubiertas con cubreobjetos de cristal con medio de montaje no acuoso (DEPEX).

Técnicas de inmunofluorescencia

Al igual que en el caso de las técnicas inmunohistoquímicas, las secciones procedentes de tejido humano fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas al proceso de desenmascaramiento antigénico. Esto no se hizo en las procedentes de tejido murino obtenidas mediante congelación. Después se lavaron con PBS 0.1M a pH 7.4 y se incubaron toda la noche a 4°C con alguno de los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS conteniendo 5% de suero normal de caballo y Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.1%:

- monoclonal anti-receptor CB₂ (R&D systems; dilución 1/50)
- policlonal anti-IBA1 (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA; dilución 1/300)
- monoclonal de rata anti-CD68 de ratón (Dako Cytomation; dilución 1/200)
- policlonal de cabra anti-receptor CB₂ (Santa Cruz Biotechnology; dilución 1/300)
- monoclonal de ratón anti-TH (Merck Millipore; dilución 1/500)
- monoclonal de rata anti-CD11b clon OX-42 (AbD Serotec; dilución 1:50)
- policlonal de conejo anti-TH (Merck Millipore; dilución 1:500)

Al día siguiente, tras varios lavados con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a 37°C durante 2 horas, seguido de incubación con estreptavidina.

Se utilizó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-546 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA; dilución 1:200), obteniendo un marcaje rojo fluorescente, el anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa Fluor-488 (Invitrogen; dilución 1:200), obteniendo así un marcaje verde fluorescente, o el anticuerpo secundario de pollo anti-cabra conjugado con Alexa-594 (Invitrogen; dilución 1:200), obteniendo de nuevo un marcaje rojo fluorescente.

Cuando se quiere estudiar la colocación de dos marcadores mediante inmunofluorescencia doble, tras realizar todo el procedimiento anterior con el primer anticuerpo primario de interés, se vuelve a someter al tejido a otra incubación durante toda la noche con el anticuerpo primario de interés y el secundario fluorescente correspondiente durante 2 horas a 37°C. De esta forma se detecta el segundo antígeno a colocar seguido de un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo con distinto espectro de emisión.

Los núcleos celulares se marcaron con bisBenzimida (Hoestch, 33258; Sigma-Aldrich), obteniendo una emisión azul fluorescente.

La autofluorescencia endógena presente en los tejidos humanos, debida a la existencia de lipofusina (Schnell *et al.*, 1999), se atenuó con negro Sudán (Merck Millipore) al 1% en etanol 70° durante 5 minutos y lavado con etanol 70°.

En el caso del tejido de ratón incubado con el anticuerpo primario monoclonal anti-TH (Merck Millipore), usamos Mouse on Mouse Immunodetection Kit (Vector Elite) para evitar la aparición de marcaje de fondo debido a la interacción de los anticuerpos secundarios con las inmunoglobulinas presentes en el tejido. Después incubamos con el anticuerpo biotinilado anti-ratón de caballo (Vector Elite, dilución 1:200) seguido de incubación con Alexa-488 conjugado con estreptavidina (Invitrogen; dilución 1:200).

Los controles negativos se realizaron mediante el mismo procedimiento en secciones similares pero omitiendo la incubación con el anticuerpo primario y/o mediante el uso de un péptido de bloqueo inmunogénico en el caso del anticuerpo anti-receptor CB₂ de R&D, como en el caso de las inmunotinciones con DAB. Todas las secciones de cada inmunodetección fueron procesadas a la vez y bajo las mismas condiciones.

Los portas se sellaron con cubreobjetos de cristal con medio de montaje acuoso Vectashield (Vector Laboratories).

Microscopía

La observación y fotografía de las secciones sometidas a técnicas histológicas simples se realizó con un microscopio Leica DMRB con cámara DFC300FX (Leica). En el caso de las co-localizaciones de las inmunofluorescencias dobles, se empleó un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica). En ambos casos se utilizaron objetivos 5x-40x dependiendo de la zona de estudio, siempre bajo las mismas condiciones de luz, brillo y contraste para cada estructura.

Para la cuantificación de la densidad de tinción e intensidad de inmunorreactividad se utilizó el software Image J (NIH). Se tuvieron en cuenta 4-6 imágenes por cada sujeto de estudio, siendo la separación entre secciones de rata y ratón de unas 200 µm. La señal de fondo se determinó para cada sección en una pequeña zona sin marcaje cercana al área de medida, siendo éste área la misma para cada estructura. Las imágenes se estandarizaron a escala de grises y se cuantificó el valor de negro puro, en unidades arbitrarias (Schneider *et al.*, 2012, Solís *et al.*, 2015). Siempre se siguió un procedimiento en el que el investigador que procesaba las muestras no conocía a qué grupo pertenecía cada animal. Los datos se expresan como el valor medio de todos los especímenes incluidos en el estudio. En el caso de las lesiones estereotáxicas unilaterales, los datos se expresaron como porcentaje de inmunotinción en el lado ipsilateral (lesionado) frente al lado contralateral (no-lesionado).

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

Para el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los genes de interés, previamente se obtuvieron secciones coronales de un grosor aproximado de 500 µm a partir de los cerebros congelados sin perfundir. Estas secciones contenían la sustancia *nigra*, el globo pálido y el estriado, por lo que posteriormente se diseccionaron estas estructuras (Palkovits, 1988).

Se aisló el ARN total de estas muestras mediante el uso del kit Fisher BioReagents SurePrep RNA/DNA/Protein Purification Kit (Fisher Scientific, Madrid, España) según

instrucciones del fabricante. Se cuantificó la cantidad de ARN extraído, midiendo absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Eppendorf Biophotometer (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) y comprobando su pureza mediante el ratio entre las absorbancias medidas a 260 y 280 nm. Después se utilizó 1 µg del ARN total para llevar a cabo la reacción de la transcripción inversa mediante el uso del kit comercial QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilgen, Alemania). El primer paso de este método consiste en la eliminación de la contaminación por ADN genómico, seguido de la reacción de la retro-transcriptasa para sintetizar una cadena simple complementaria del ADN de la muestra.

Para la realización de la PCR cuantitativa se empleó este ADN complementario (ADNc) junto con la mezcla de reacción FastStart Taqman Probe Master (Roche, Madrid, España) y alguna de las siguientes sondas Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

- receptor CB₁ (ref. Mm00432621_s1),
- receptor CB₂ (ref. Mm02620087_s1),
- enzima FAAH (ref. Mm00515684_m1),
- enzima MAGL (ref. Mm00449274_m1),
- TNF-α (ref. Mm99999068_m1),
- IL-1β (ref. Mm00434228_m1),
- enzima iNOS (ref. Mm00440502_m1),
- enzima COX-2 (ref. Mm00478372_m1),
- enzima ALDH1A1 (ref. Mm00657317_m1)
- enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, como control endógeno para la normalización de los valores; ref. Mm99999915_g1).

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y el límite de ciclo o *threshold cycle* (C_t) fue calculado por el software del aparato. Los niveles de expresión fueron calculados por el método de la segunda derivada o 2^{-ΔΔC_t} (Livak y Schmittgen, 2001).

Cuantificación del contenido en dopamina por HPLC

A partir de los cerebros congelados de rata se obtuvieron manualmente secciones coronales de unos 500 µm de espesor, a nivel del

caudado-*putamen*, globo pálido y la sustancia *nigra*. Posteriormente, estas estructuras fueron diseccionadas y homogeneizadas con la ayuda de un sonicador en 20-40 volúmenes de KPBS frío 150 mM, pH 6,8 para analizar su contenido en DA y glutamato. Se determinó la concentración de proteína de cada homogeneizado por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) .

El contenido en DA del estriado se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica siguiendo el protocolo utilizado por Lastres-Becker *et al.* (2005) y García-Arencibia *et al.* (2007). Los homogeneizados se diluyeron en ácido perclórico 0.2 N frío conteniendo 0.2 mM de disulfito de sodio y EDTA 0.45 mM, y dihidroxibenzilamina a 20 ng/ml (Sigma-Aldrich) que se añade como patrón interno. Los homogeneizados diluidos fueron entonces centrifugados y los sobrenadantes fueron inyectados en el sistema HPLC. El sistema de HPLC consistía en una bomba Spectra-Physics 8810 y una columna RP-18 (Tracer Excel 120 ODSB; 150 mm, 4,6 mm, y 5 µm de tamaño de partícula; Teknokroma, Barcelona, Catalunya). La fase móvil, previamente filtrada y desgasificada, consistía en una solución de ácido cítrico 100 mM, acetato sódico 100 mM, heptanosulfonato 1,2 mM, EDTA 1 mM y 7% de metanol (pH 3,9) y la velocidad de flujo fue de 0.8 ml/min. El efluente fue monitorizado con un detector Coulochem (Coulochem III, ESA) mediante un proceso de oxidación/reducción (célula condicionadora: +360 mV; célula analítica nº 1: 50 mV; célula analítica nº 2: -340 mV). La señal fue registrada en un integrador Spectra-Physics 4290 desde la célula analítica nº 2, con una sensibilidad de 50 nA (10 pg por muestra). Los niveles de DA se calcularon comparando el área correspondiente al pico de elución de este neurotransmisor con el área correspondiente al patrón interno. Los valores se expresaron como ng de DA/mg de proteína.

Cuantificación del contenido en glutamato

Se analizó el contenido en glutamato de los homogeneizados de estriado, sustancia *nigra* y globo pálido empleados también para la cuantificación de DA por HPLC. Para este fin se utilizó el kit comercial Glutamate Assay Kit #K629-100 (BioVision). Los valores se calcularon como nmol de glutamato/mg de proteína y se expresaron como porcentaje sobre los controles.

Estadística

Los datos se representan como valor medio \pm error estándar (SEM). Cuando se estudian dos grupos experimentales independientes, los datos fueron sometidos al *test* de la *t* de Student de dos colas. En los casos con más de dos grupos experimentales independientes, los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del *test post hoc* Student-Newman-Keuls, o a una ANOVA de dos vías seguido del *test* de Bonferroni cuando se trataba de medidas repetidas. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se consideran estadísticamente significativos los contrastes de hipótesis con una $p < 0.05$.





RESULTADOS



Diseño I: Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson

Los procesos inflamatorios que contribuyen a la muerte neuronal en la EP están relacionados directamente con una regulación al alza del Sistema Endocannabinoide (Di Marzo *et al.*, 2000, Lastres-Becker *et al.*, 2001, Pisani *et al.*, 2005), ejemplarizada en el receptor CB₂ presente en astrocitos (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014), y microglía (Stella, 2010), que experimenta una elevación muy marcada. En este estudio, investigamos los cambios en la expresión de este receptor en los ganglios basales, centrándonos primero en la sustancia *nigra* de pacientes afectados por la EP, con el fin de estudiar si la elevación del receptor CB₂ ocurre en los mismos sustratos gliales que en otras patologías (Benito *et al.*, 2003, Yiangou *et al.*, 2006, Palazuelos *et al.*, 2009, Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014).

Expresión del receptor CB₂ asociado a activación glial en la sustancia *nigra* de pacientes con Enfermedad de Parkinson

Comenzamos estudiando la microgliosis presente en la sustancia *nigra* de los pacientes de EP e individuos sanos analizando mediante inmunofluorescencia el marcador microglial IBA1. Como esperábamos, los individuos enfermos presentaban un mayor marcaje, hasta tres veces más, que los individuos sanos. Mediante la detección de la glicoproteína de células mieloides CD68, usada aquí como marcador de microglía activada, macrófagos y monocitos, comprobamos que la mayor parte de la microglía de los pacientes tiene morfología de microglía activada como se puede ver en la Figura 16.

Una vez constatado que existe un aumento acusado de la microgliosis reactiva en el tejido de los pacientes afectados por la EP, realizamos un estudio inmunohistoquímico enfocado a determinar la expresión del receptor CB₂ en estos tejidos, observando una clara inmunorreactividad en todos los individuos parquinsonianos, mientras que estaba prácticamente ausente en todos los individuos control (Figura 17).

Además, muchas de las células marcadas con el anticuerpo anti-receptor CB₂, utilizando DAB, mostraban claramente morfología microglial, como se puede ver más detalladamente en la Figura 18. Este hecho sólo se encontró en 1 de los 5 casos control estudiados, mientras que estaba presente en todas las secciones de los 5 casos de EP.

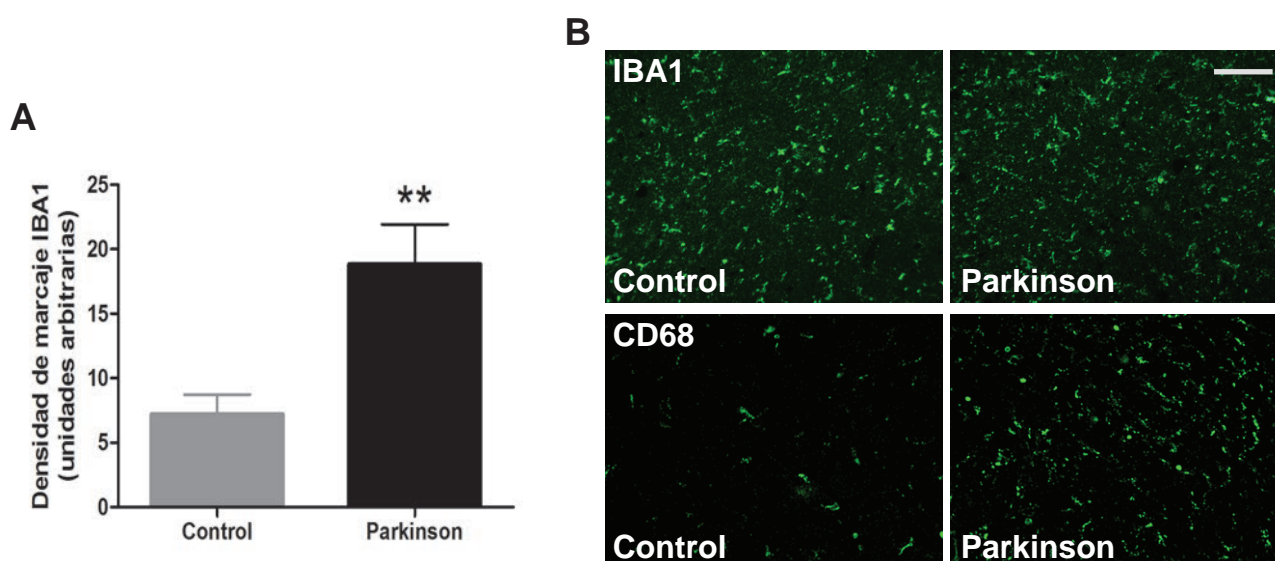


Figura 16. A. Cuantificación de la inmunofluorescencia de IBA1 en la sustancia *nigra* de los pacientes de EP y sujetos control. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=3-5$ sujetos por grupo) y los datos están sujetos al test de la t de Student (** $p<0.01$). B. Micrografías representativas correspondientes a las inmunofluorescencias de IBA1, y CD68 en la sustancia *nigra* de un paciente de EP y un individuo sano. Barra de escala = 50 μ m.

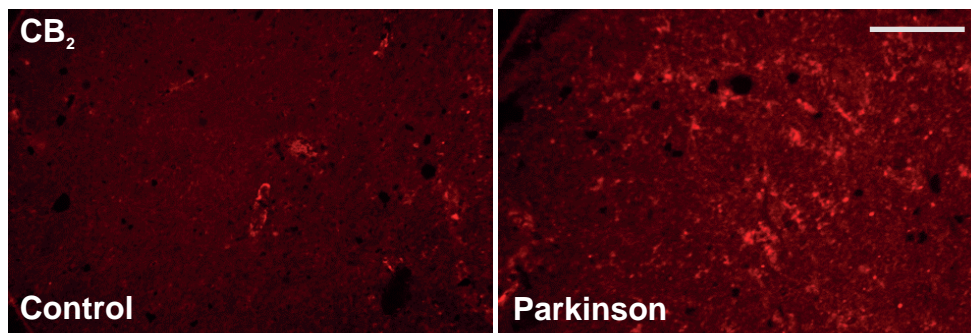


Figura 17. Micrografías representativas correspondientes a las inmunofluorescencias de CB_2 en la sustancia nigra de un paciente de EP y un individuo sano (Barra de escala = 50 μm).

Para comprobar que, efectivamente, el receptor CB_2 estaba localizado en células de microglía, se llevaron a cabo inmunofluorescencias dobles en la sustancia *nigra* de los enfermos de EP, donde pudimos observar que las células que expresaban el receptor CB_2 también presentaban un marcaje positivo para IBA1, confirmando así que se trataba de células microgliales y posiblemente macrófagos periféricos reclutados en el lugar de la lesión, como se puede observar en la Figura 19A.

Además cuantificamos esa colocalización y pudimos encontrar que la inmunorreactividad para el receptor CB_2 presente en la microglía es mucho más elevada en los pacientes de EP que en los individuos sanos (Figura 19B).

No obstante, también observamos células marcadas con el anticuerpo anti-receptor CB_2 que no presentaban señal para IBA1. Teniendo en cuenta resultados obtenidos en otras enfermedades neurodegenerativas, podría tratarse de astrocitos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010), aunque este hecho no lo hemos comprobado en este estudio.

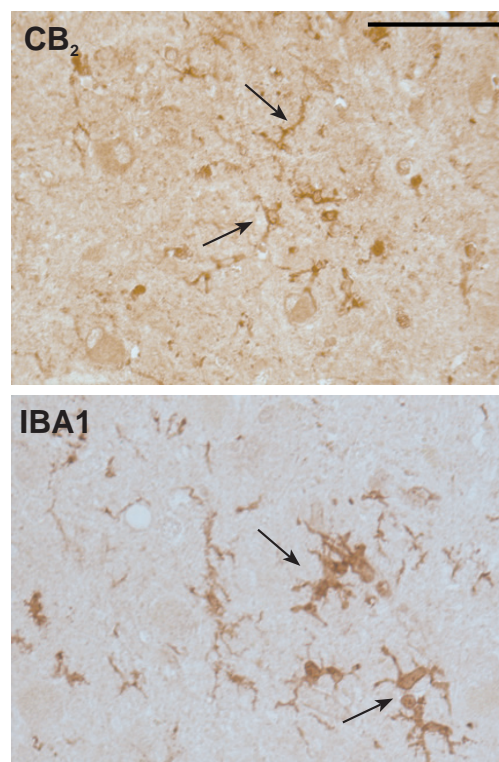


Figura 18. Micrografías representativas de la inmunotinción de CB_2 e IBA1 en la sustancia nigra de un paciente de EP. Las flechas indican células con morfología microglial (Barra de escala = 25 μm).

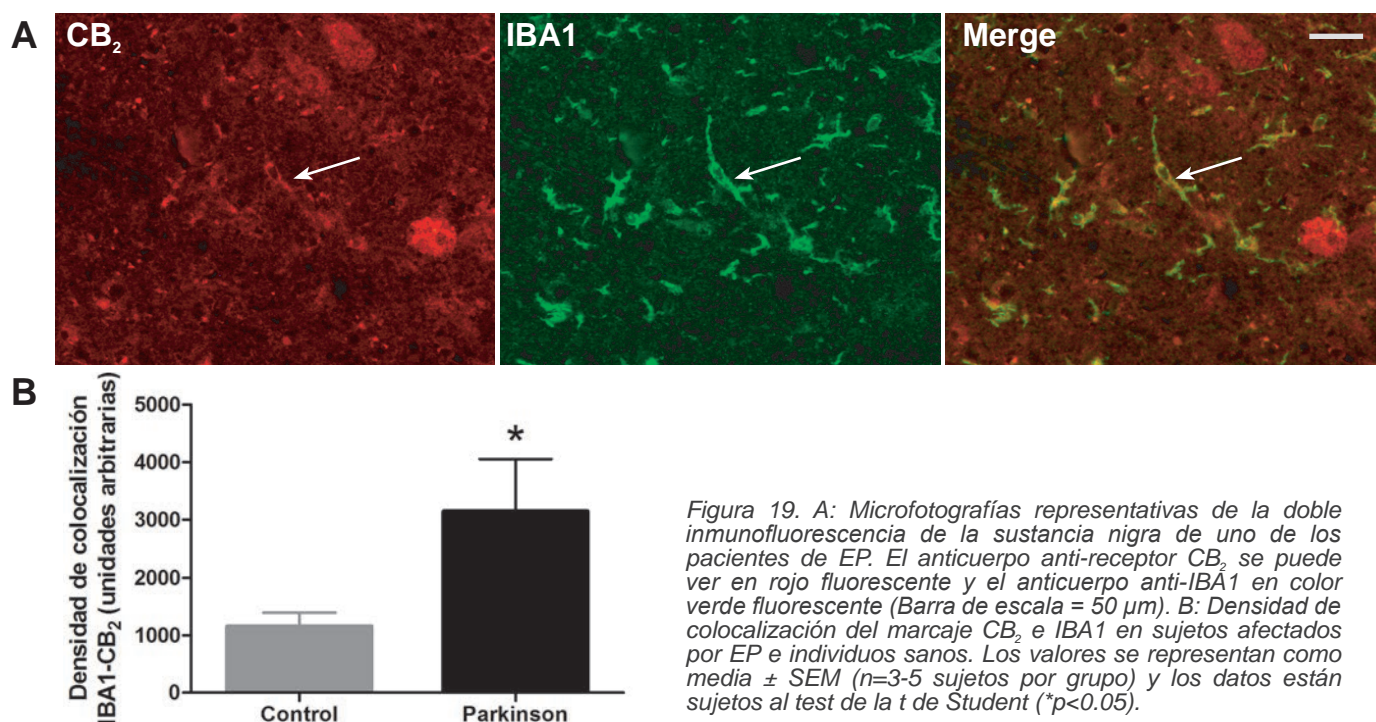


Figura 19. A: Microfotografías representativas de la doble inmunofluorescencia de la sustancia nigra de uno de los pacientes de EP. El anticuerpo anti-receptor CB_2 se puede ver en rojo fluorescente y el anticuerpo anti-IBA1 en color verde fluorescente (Barra de escala = 50 μm). B: Densidad de colocalización del marcaje CB_2 e IBA1 en sujetos afectados por EP e individuos sanos. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=3-5$ sujetos por grupo) y los datos están sujetos al test de la *t* de Student (* $p<0.05$).

Expresión del receptor CB₂ asociado a activación glial en modelos animales de Enfermedad de Parkinson

Quisimos comprobar si los resultados obtenidos en el tejido *post mortem* humano se reproducían en un modelo experimental clásico de EP, como es el de roedores lesionados con la toxina oxidativa 6-OHDA. De ser así, este modelo serviría para aplicar estrategias farmacológicas basadas en cannabinoides con actividad sobre el receptor CB₂.

Cuando estudiamos la expresión del receptor CB₂ mediante qRT-PCR, observamos que no existían variaciones entre los niveles de ARNm en estriado y en sustancia *nigra* de los ratones lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA como se puede observar en la Figura 20.

Aunque mediante inmunotinción, sí se observa un aumento de la expresión del receptor CB₂, pero muy localizado en el área de la lesión (Figura 21), por lo que la diferencia entre *sham* y lesionados se diluye al realizar la cuantificación en un área más extensa.

Cuando lesionamos ratas en el m.f.b. con 6-OHDA, nos encontramos con un marcaje muy débil del receptor CB₂ en la sustancia *nigra*, apenas unas pocas células marcadas (Figura 22) y prácticamente ninguna diferencia con el lado contralateral no lesionado.

Aunque las células marcadas con el anticuerpo anti-receptor CB₂ encontradas en el lado lesionado que también presentaban un marcaje positivo para OX-42 en el análisis de doble marcaje eran pocas, este hecho indicaría que se trata de microglía activada (Figura 23).

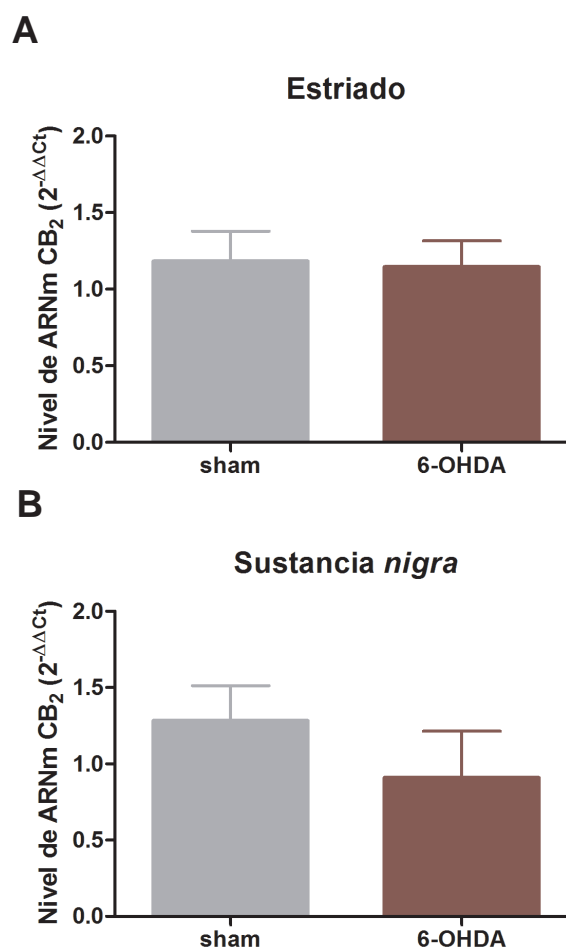


Figura 20. Niveles de expresión de ARNm para el receptor CB₂ medidos en estriado (A) y sustancia nigra (B) de ratones lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA o salino (*sham*). Los valores son medias \pm SEM ($n = 7-8$ animales por grupo) y están expresados en comparación con el lado contralateral no lesionado de cada animal. Los datos se sometieron al test de la *t* de Student ($p < 0.05$).

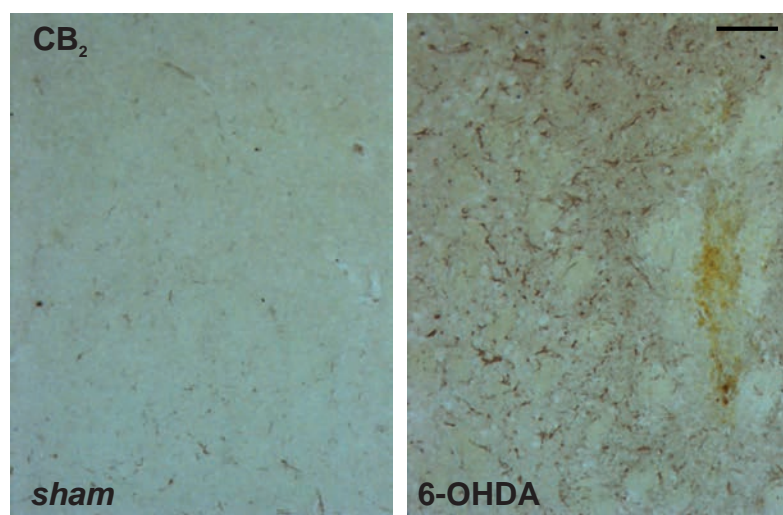


Figura 21. Secciones representativas de la inmunotinción para el receptor CB₂ en el estriado de ratones lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA o con operación simulada (*sham*) (Barra de escala = 100 μ m).

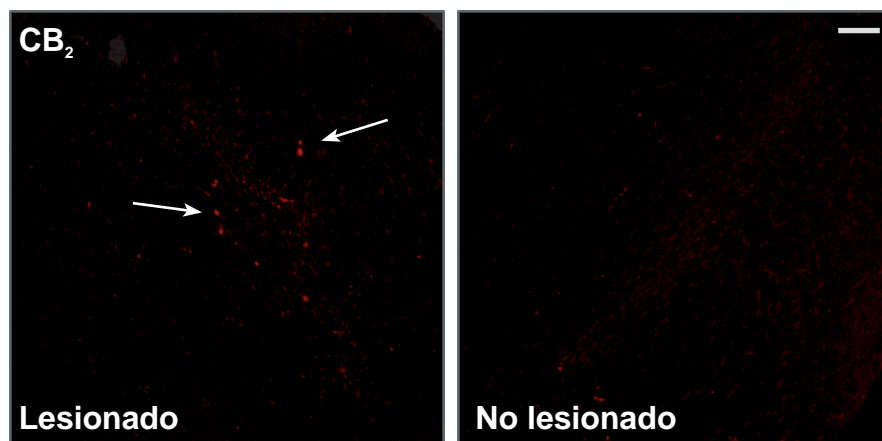


Figura 22: Secciones representativas de la inmunofluorescencia para el receptor CB_2 de la sustancia nigra de ratas lesionadas unilateralmente (m.f.b.) con 6-OHDA (Barra de escala = 100 μ m). Las flechas indican células CB_2 -positivas.

Para comprobar si el receptor CB_2 representa una defensa frente a la lesión con 6-OHDA, lesionamos ratones *knock-out* para este receptor con la toxina administrada a nivel intraestriatal y cuantificamos las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* mediante inmunotinción con el anticuerpo anti-TH. Observamos que los ratones $CB_2^{-/-}$ presentaban una pérdida neuronal aproximada del 50%, similar a la que presentaban sus hermanos de camada *wild-type* (Figura 24), lo que significa que la ausencia del receptor CB_2 no eleva el grado de daño neuronal o aumenta la vulnerabilidad frente a la neurotoxina.

De forma general, los estudios realizados tras la lesión con 6-OHDA confirman que el receptor CB_2 se encuentra expresado muy levemente, como respuesta a la denervación producida por

esta neurotoxina, quizá debido a que la 6-OHDA no produce la muerte neuronal por inflamación como evento primario, sino que produce primordialmente daño oxidativo y disfunción mitocondrial que desencadenarían una respuesta inflamatoria pero solo de manera muy secundaria y muy limitada en intensidad. Así, este modelo quizá no sea el más adecuado para el ensayo de estrategias farmacológicas basadas en agonismo/antagonismo del receptor CB_2 , algo que avalan estudios previos de neuroprotección con diferentes cannabinoides en este modelo que establecieron un efecto beneficioso solo en el caso de aquellos cannabinoides con perfil antioxidante o independiente de receptores CB_1 y CB_2 (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007).

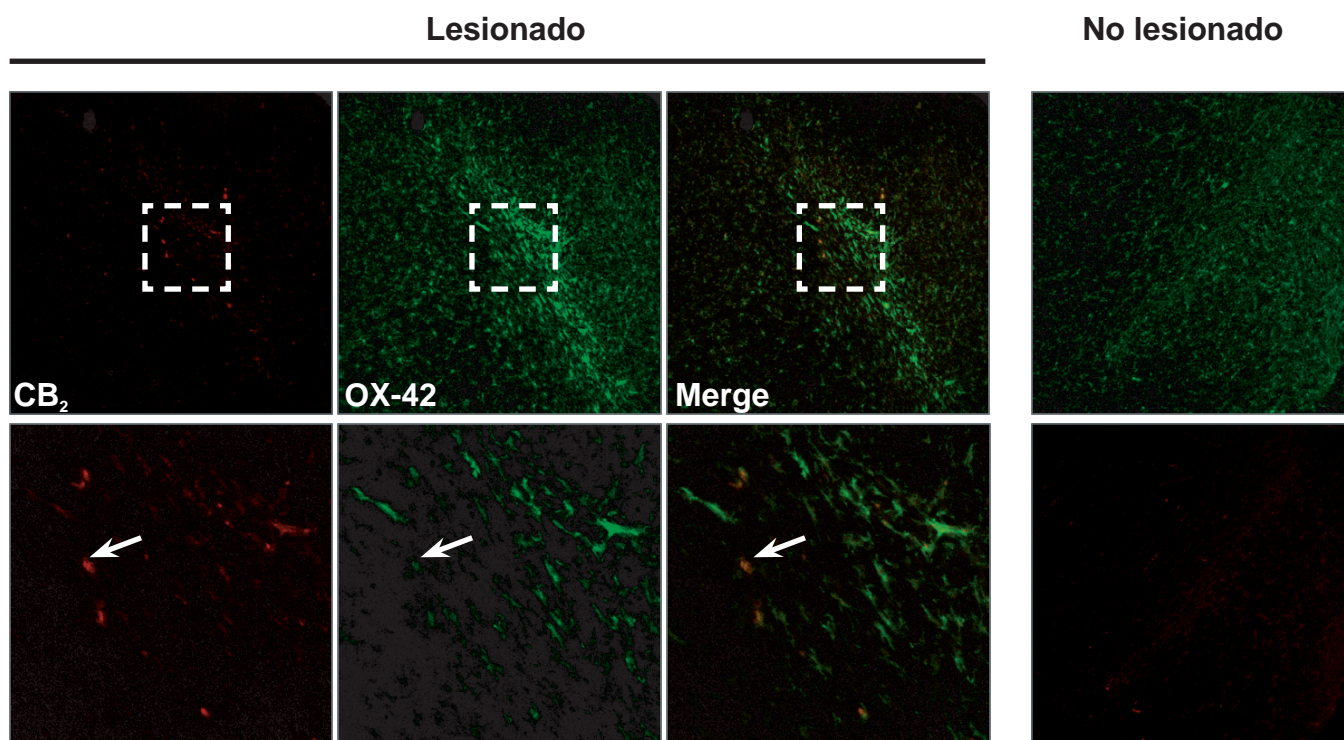


Figura 23. Microfotografías representativas de la doble inmunofluorescencia de la sustancia nigra de ratas lesionadas unilateralmente (m.f.b.) con 6-OHDA y su comparación con el lado contralateral no-lesionado. Las flechas indican células CB_2 y OX-42-positivas. El anticuerpo anti-receptor CB_2 se puede ver en rojo fluorescente y el anticuerpo anti-OX-42 en color verde fluorescente (Barra de escala = 50 μ m).

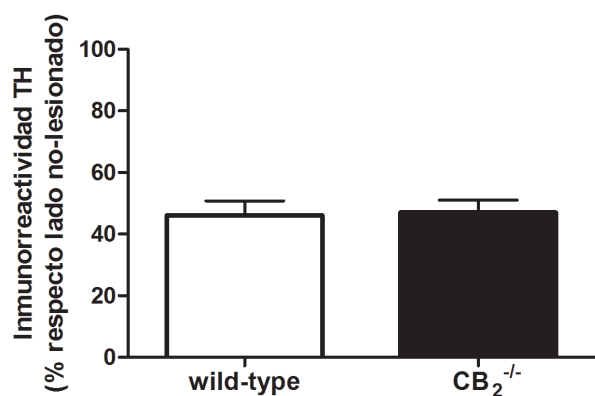


Figura 24: Densidad de marcaje de la inmunofluorescencia de TH medida en la sustancia nigra de ratones deficientes en el receptor CB₂ y wild-type lesionados unilateralmente con 6-OHDA. Los valores son medias \pm SEM ($n = 5-6$ animales por grupo) y están expresados en % de inmunorreactividad en el lado lesionado frente al lado no-lesionado en el mismo animal. Los datos se sometieron al test de la *t* de Student ($p < 0.05$).

Buscando otros modelos de lesión con mayor influencia de la inflamación como evento patogénico y en los que se reprodujese de forma evidente la sobreexpresión del receptor CB₂ que encontramos en el tejido humano, utilizamos un modelo inflamatorio de lesión nigroestriatal con LPS (Hunter *et al.*, 2009). Mediante la técnica de la qRT-PCR detectamos que cuando se administraba la toxina intraestriatalmente, se producía un aumento significativo de la expresión del receptor CB₂ en la sustancia *nigra*, y en mayor medida, en el estriado (Figura 25).

También llevamos a cabo la inmunotinción del receptor CB₂ y encontramos que era más intensa en el estriado (Figura 26) y en la sustancia *nigra* (Figura 27) del lado lesionado con respecto al lado no lesionado. En esta última estructura, las células poseen un marcaje y una morfología similares a las observadas en la sustancia *nigra* de humanos descrito en el apartado anterior.

Al igual que se hizo en el caso de las lesiones con 6-OHDA, para comprobar si la ausencia del receptor CB₂ hace más vulnerables a las neuronas frente al efecto de la toxina LPS, lesionamos ratones deficientes en el receptor CB₂ y observamos que el grado de lesión era mayor que en el caso de sus hermanos *wild-type*. En los ratones *knock-out* el marcaje de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* mediante inmunotinción para TH disminuía hasta un nivel del 32%, en comparación con el 57% de los *wild-type* (Figura 28).

Dada esta diferencia en el grado de lesión, quisimos comparar la intensidad de la actividad glial de los ratones deficientes para el receptor CB₂ en comparación con la respuesta de sus

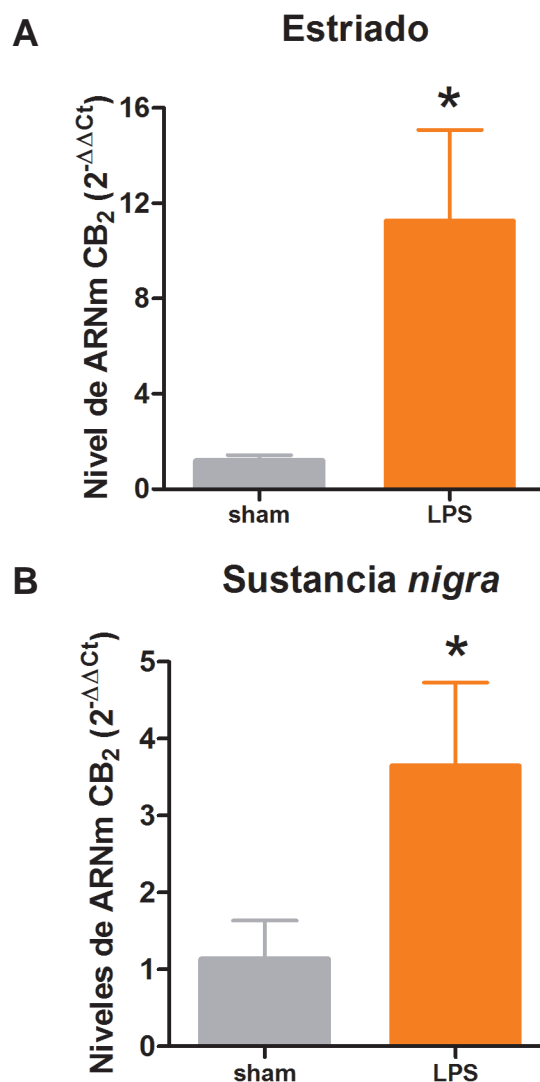


Figura 25: Niveles de expresión de ARNm para el receptor CB₂ medidos en estriado (A) y sustancia nigra (B) de ratones lesionados intraestriatalmente con LPS o salino (sham). Los valores son medias \pm SEM ($n = 7-8$ animales por grupo) y están expresados en comparación con el lado contralateral no lesionado de cada animal. Los datos se sometieron al test de la *t* de Student ($*p < 0.05$).

hermanos *wild-type*. Para ello, analizamos CD68 mediante inmunotinción. Encontramos que el aumento de CD68 en el estriado lesionado era de una magnitud similar en ambos genotipos (Figura 28), algo normal teniendo en cuenta que la inyección estereotáxica se produce en esta estructura. Pero en el caso de la sustancia *nigra*, los ratones *knock-out* presentan una elevación significativa de CD68 en el lado lesionado frente al no-lesionado (Figura 29B), hecho que no ocurre en los *wild-type*, en los que el nivel de marcaje es prácticamente igual en un lado respecto al otro. Interpretamos esta diferencia como resultado de una mayor propagación de la respuesta inflamatoria desde el estriado (lugar de la administración del LPS) a las áreas contiguas (por ejemplo, la sustancia *nigra*) en los ratones deficientes en CB₂, cosa que no ocurre en los *wild-type*. Como alternativa, puede

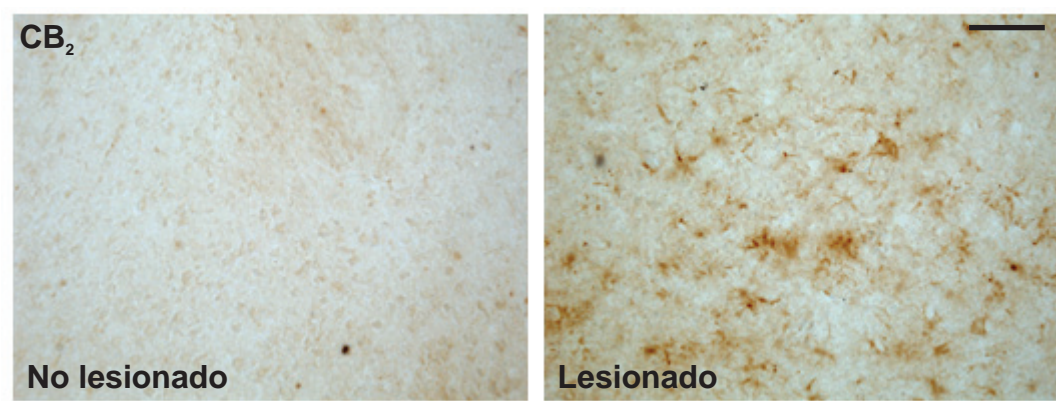


Figura 26: Secciones representativas de la inmunotinción del receptor CB₂ en el estriado de ratones lesionados unilateralmente con LPS y ratones control (barra de escala = 50 μ m).

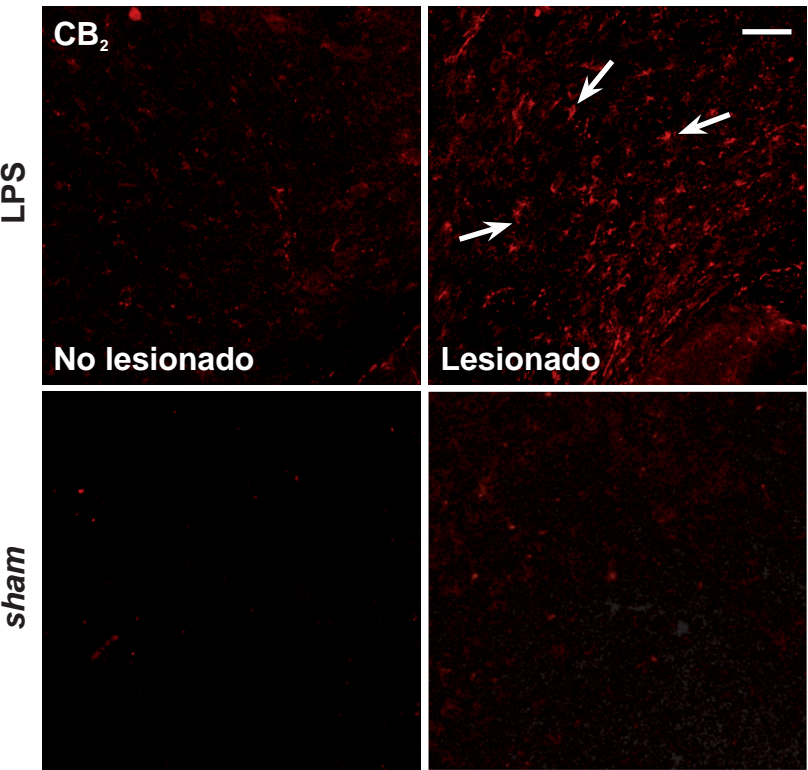


Figura 27: Secciones representativas de la inmunofluorescencia para el receptor CB₂ en la sustancia nigra de ratones lesionados unilateralmente con LPS y sham (Barra de escala = 50 μ m). Las flechas indican células CB₂-positivas.

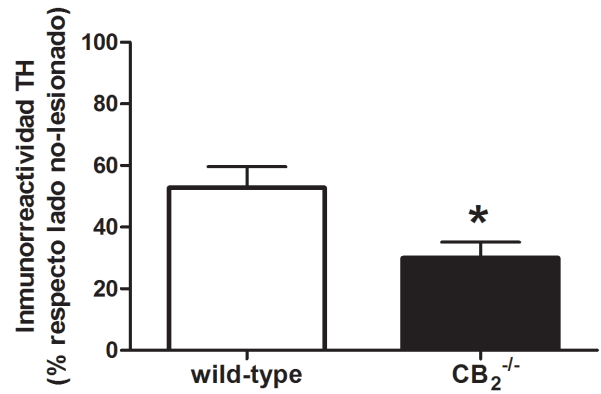


Figura 28 Densidad de marcaje de la inmunofluorescencia de TH medida en la sustancia nigra de ratones deficientes en el receptor CB₂ y wild-type lesionados unilateralmente con LPS. Los valores son medias \pm SEM (n= 5-6 ratones por grupo) y están expresados en % de inmunorreactividad en el lado lesionado frente al lado no-lesionado en el mismo animal. Los datos se sometieron al test de la t de Student (*p<0.05).

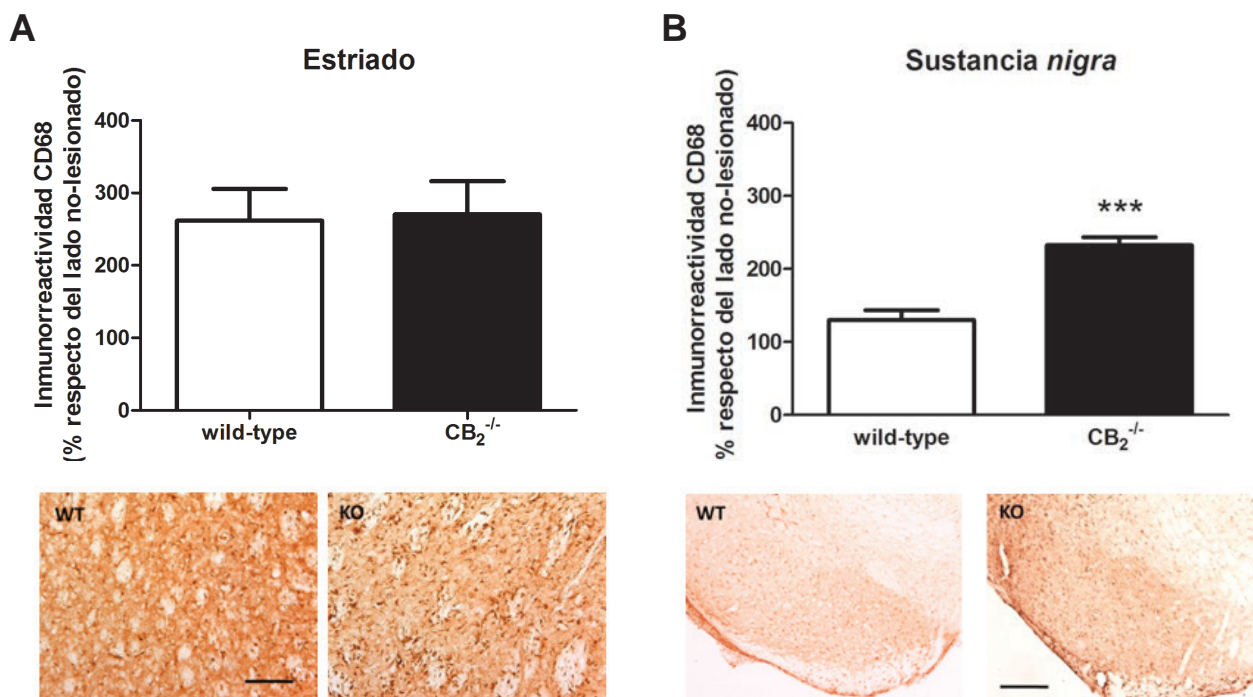


Figura 29. Cuantificación de la inmunotinción para CD68 en el estriado (A) y en la sustancia nigra (B) de ratones CB₂^{-/-} y wild-type después de 2 semanas tras la lesión intraestriatal con LPS. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=4-8$ animales por grupo) y están expresados en % de inmunorreactividad en el lado lesionado frente al lado no-lesionado en el mismo animal. Los datos se sometieron al test de la *t* de Student (***) $p<0.001$). Se incluyen microfotografías representativas en los paneles inferiores (Estriado, barra de escala = 25 μ m; Sustancia nigra, barra de escala = 250 μ m).

ser que la mayor inmunotinción de CD68 en la sustancia *nigra* refleje el mayor grado de muerte de las neuronas TH-positivas tras la lesión con LPS. Por tanto, el aumento en la extensión de la microgliosis observado en los ratones *knock-out* para el receptor CB₂ demuestra la implicación de este receptor en una respuesta endógena cuyo objetivo sería limitar la activación microglial tras la lesión.

Expresión del receptor CB₂ en neuronas de la sustancia *nigra*. Datos en pacientes con Enfermedad de Parkinson

Los datos de sobreexpresión del receptor CB₂ en microglía activada en muestras *post mortem* de pacientes con EP o de modelos experimentales de esta enfermedad son bastante concordantes con los hallazgos descritos por otros autores en el modelo de lesión con MPTP (Price *et al.*, 2009) y, en general, con lo descrito en otras enfermedades neurodegenerativas (Ashton y Glass, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros análisis pusieron de manifiesto un hecho, sólo visto en muestras *post mortem* humanas, tanto de pacientes parquinsonianos como de individuos control, como fue la presencia del receptor CB₂ en las propias neuronas nigrales que degeneran en la EP. Un hecho similar se ha descrito en las

neuronas de Purkinje del cerebelo de pacientes de ataxias espinocerebelosas (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014). En nuestro caso, observamos que en las muestras *post mortem* humanas, en la sustancia *nigra* se marcaban con el anticuerpo anti-receptor CB₂ lo que podrían ser neuronas nigrales por su morfología, como se puede ver en la Figura 30. Contrariamente a la idea establecida de que el único receptor cannabinoide presente en neuronas es el CB₁ (Lynn y Herkenham, 1994), diversos estudios han encontrado subpoblaciones neuronales que expresan CB₂ en las proyecciones palidotalámicas (Lanciego *et al.*, 2011), en ciertos núcleos del tallo cerebral

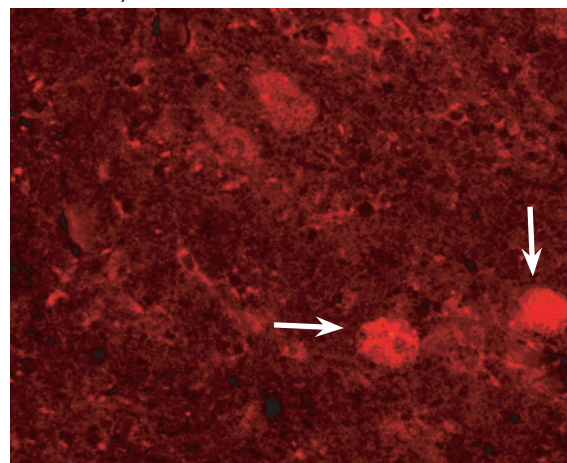


Figura 30. Sección representativa de la inmunofluorescencia para el receptor CB₂ en la sustancia nigra de uno de los pacientes de EP (Barra de escala = 50 μ m). Las flechas indican células marcadas con el anticuerpo anti-receptor CB₂ con morfología neuronal.

relacionados con el control de la émesis (Van Sickle *et al.*, 2005), en las neuronas granulares del cerebelo (Skaper *et al.*, 1996), además de las ya mencionadas neuronas de Purkinje, también en el cerebelo, (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014). Se trata, no obstante, de una distribución relativamente discreta y sin el carácter de ubicuidad característico del receptor CB₁. Para asegurarnos de la especificidad del anticuerpo utilizado, y dada la controversia en la expresión del receptor CB₂ en neuronas (Atwood y Mackie, 2010), además de realizar controles negativos mediante la omisión del anticuerpo primario, comprobamos que el marcaje observado era enmascarado por un péptido de bloqueo dirigido contra la zona N-terminal del receptor CB₂ (Figura 31), demostrando así que no se debía a marcaje inespecífico del anticuerpo.

Para identificar el sustrato celular que contenía este marcaje CB₂-positivo, primero nos basamos en el análisis de la morfología, que como ya se ha dicho antes, parecía corresponder a neuronas nigrales. Después nos fijamos en el hecho de que se trataba de neuronas que contenían neuromelanina, característica intrínseca de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* (Figura 32).

En un siguiente paso, y para una confirmación definitiva, decidimos realizar estudios de doble marcaje con el anticuerpo anti-receptor CB₂ y con el anticuerpo dirigido contra TH. Esta doble inmunofluorescencia reveló que las células que

expresaban el receptor CB₂ también presentaban marcaje positivo para TH, confirmando así que se trataba de neuronas dopaminérgicas (Figura 33).

Dado que las neuronas nigrales en las que vimos la inmunofluorescencia para el receptor CB₂ son las que degeneran en la EP, quisimos investigar cómo se modifica la inmunotinción neuronal en los pacientes respecto de los sujetos control. En primer lugar, pudimos observar que las neuronas dopaminérgicas de los pacientes de EP presentaban una morfología alterada, con el soma dilatado y alteraciones en las dendritas (Figura 33). Al cuantificar la señal del receptor CB₂, usando en este caso DAB, comprobamos que ésta era menor debido a que los pacientes presentaban menos número de células, como corresponde a la patología (Figura 34A), pero si analizamos la intensidad de marcaje en función del número de células, comprobamos que este parámetro también es menor en los individuos parquinsonianos (Figura 34B). Esta disminución en los niveles de receptor CB₂ en las neuronas nigrales, puede estar relacionada con el propio proceso patológico, pudiendo ser utilizado como signo de degeneración de las células que aún sobreviven, quizá como posible biomarcador ya que se dispone de ligandos fluorados del receptor CB₂ para estudios de PET (Ahmad *et al.*, 2013). No obstante, es necesaria una investigación más profunda para confirmar el valor del receptor CB₂ nigral como biomarcador.

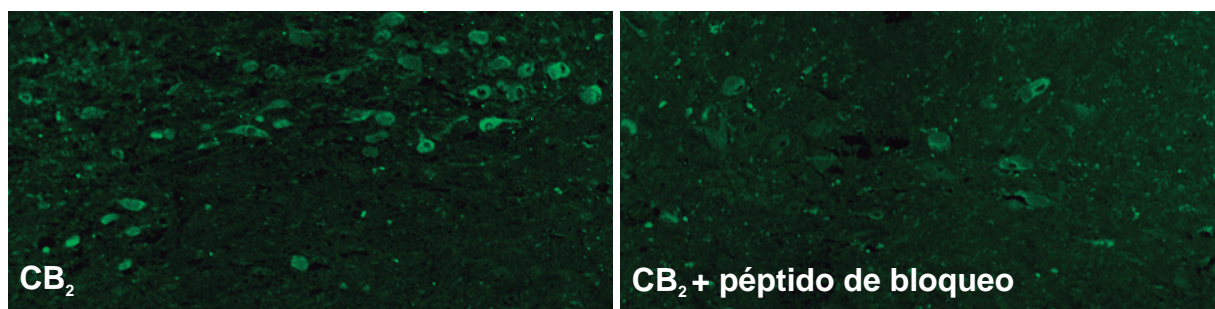


Figura 31. Micrografías representativas correspondientes al detalle de la inmunofluorescencia de CB₂ con péptido de bloqueo y sin él, en la sustancia nigra de un paciente de EP.

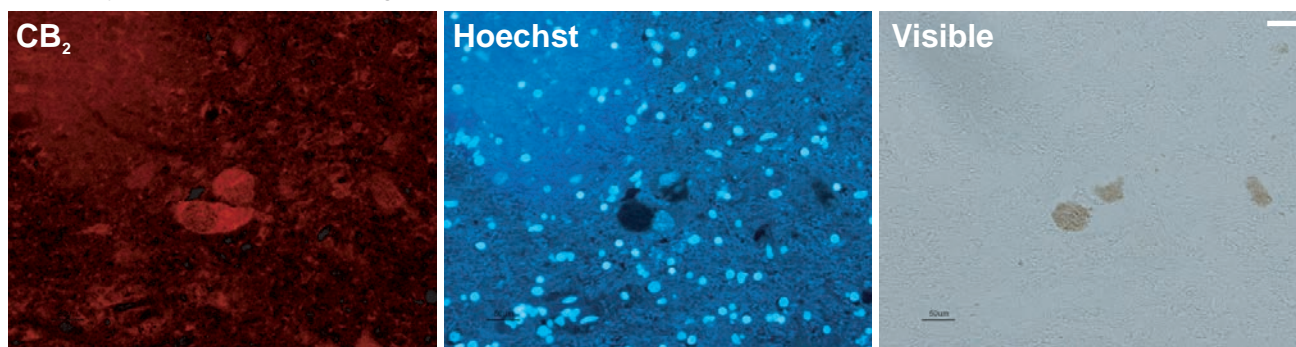


Figura 32. Microfotografías representativas de la inmunofluorescencia de la sustancia nigra de uno de los pacientes de EP. El anticuerpo anti-receptor CB₂ se puede ver en rojo fluorescente, los núcleos marcados con Hoechst y la neuromelanina detectable con luz visible (Barra de escala = 50 µm).

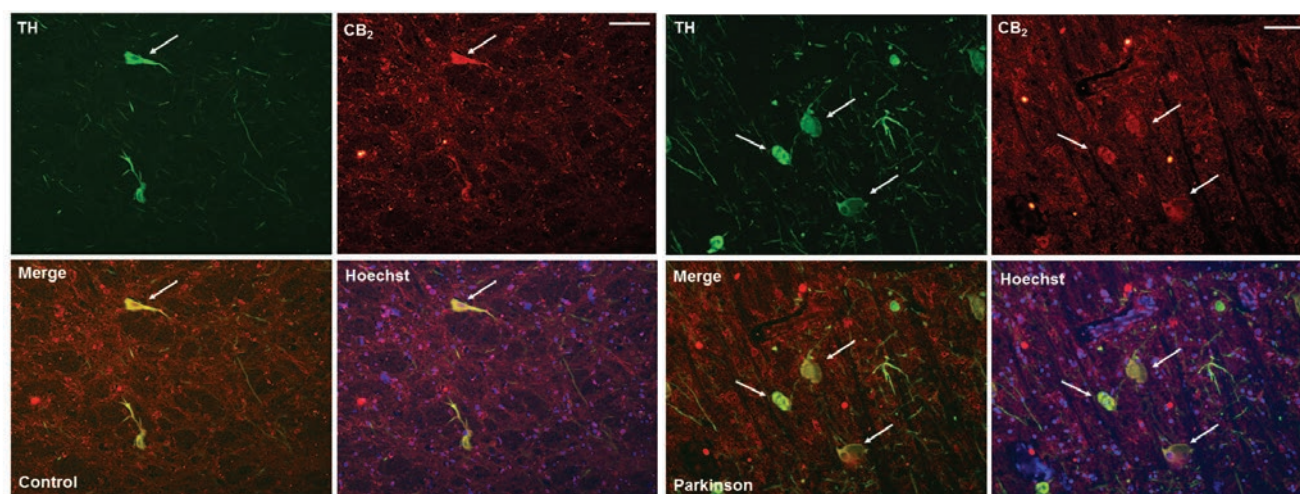
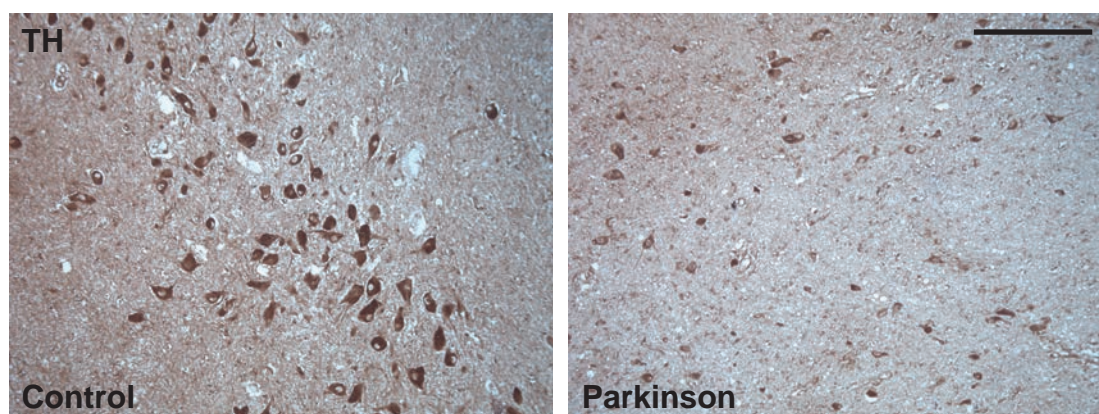


Figura 33. Microfotografías representativas realizadas mediante microscopía confocal de la doble inmunofluorescencia de la sustancia nigra de un paciente de EP y un individuo control sano. El anticuerpo anti-receptor CB_2 se puede ver en rojo fluorescente, el anticuerpo anti-TH en color verde fluorescente, los núcleos marcados con Hoechst en color azul (Barra de escala = 50 μ m).

A



B

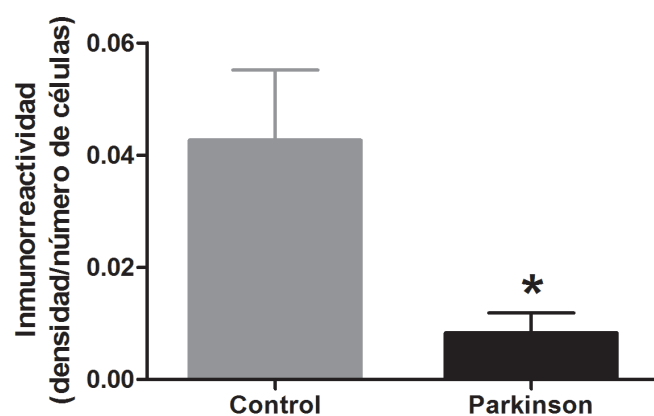


Figura 34. A: Microfotografías representativas de la inmunotinción de TH en la sustancia nigra de uno de los pacientes de EP y un individuo sano (Barra de escala = 50 μ m). B: Cuantificación de la inmunotinción del receptor CB_2 en la sustancia nigra de pacientes de EP e individuos sanos. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=5$ sujetos por grupo) y están sujetos al test de la t de Student (* $p < 0.05$).

Diseño II: Potencial terapéutico de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

Como se ha explicado en la Introducción y en los Objetivos, existen importantes evidencias experimentales para asumir que ciertos tipos de cannabinoides con actividad sobre diferentes aspectos etiopatogénicos de la EP podrían servir para el desarrollo de una terapia cannabinoide polivalente en esta enfermedad. En esta Tesis Doctoral nos planteamos investigar varias dianas potenciales para un tratamiento neuroprotector, principalmente el receptor CB₂ y la activación de PPARs asociados a efectos antiinflamatorios y efectos antioxidantes independientes de receptor, pero también hemos estudiado el efecto agudo o puntual de alguno de estos cannabinoides sobre síntomas específicos como la inhibición motora, e incluso que pudieran servir para atenuar las consecuencias a medio-largo plazo (disquinesia) de las terapias clásicas de reemplazo dopaminérgico usadas habitualmente para el tratamiento de los síntomas.

Abordamos primero, por tratarse del objetivo principal de esta Tesis Doctoral, las posibilidades de desarrollar una terapia neuroprotectora basada en tres tipos de compuestos:

- HU-308, un agonista selectivo del receptor CB₂
- VCE-003.2, un derivado del CBG con actividad agonista PPAR y actividad antioxidante
- El fitocannabinoide Δ⁹-THCV, un compuesto que puede reunir en una sola molécula varias de estas propiedades a la vez, con efectos sobre los síntomas como la bradiquinesia y la disquinesia

Neuroprotección con cannabinoides por agonismo CB₂ y capacidad antioxidante

Neuroprotección con Δ⁹-THCV y HU-308 en ratones lesionados con LPS

Como se ha visto en la Introducción, la expresión del receptor CB₂ se encuentra aumentada en las enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2015), entre las que se incluiría la EP (modelo de ratones lesionados con MPTP; Price *et al.*, 2009). Los datos obtenidos en el diseño anterior han corroborado esta sobreexpresión del receptor CB₂, principalmente en la microglía reactiva, en muestras *post mortem* de pacientes y también en modelos inflamatorios de la EP como el modelo de lesión intraestriatal con LPS. Basándonos en esas observaciones, se propuso el uso de compuestos agonistas CB₂ que posiblemente actuarían reduciendo la activación glial, como estrategia farmacológica frente a la degeneración que se produce en la enfermedad (Ashton y Glass, 2007, Sagredo *et al.*, 2007).

Debido a que la muerte neuronal en el modelo de 6-OHDA se produce principalmente por estrés oxidativo y disfunción mitocondrial y que hemos visto en apartados anteriores que el receptor CB₂ sufre pocos cambios en este modelo, no estando implicado en la respuesta defensiva endógena a la lesión, optamos por llevar a cabo los siguientes experimentos de neuroprotección con compuestos agonistas CB₂ en un modelo de la enfermedad en el que la muerte neuronal se produzca primordialmente por activación glial y por la neuroinflamación asociada, como es el modelo de LPS. En el Diseño I vimos que en este modelo aumentaba la microgliosis y la expresión de los receptores CB₂ en el lugar de la lesión y que los ratones CB₂^{-/-} eran más vulnerables al daño nigroestriatal, todos ellos, hechos indicativos de que la actuación sobre este receptor podría conllevar a una mejora en los parámetros relacionados con la inflamación, y, por tanto, en la supervivencia neuronal.

Para estos experimentos utilizamos un agonista selectivo CB₂ y el fitocannabinoido Δ⁹-THCV, que a su actividad como agonista CB₂ suma otras propiedades interesantes para el tratamiento de la EP, por ejemplo tener propiedades antioxidantes intrínsecas de la propia molécula y posiblemente también actividad PPAR. Cuando se administró el fitocannabinoido Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹) o el agonista selectivo CB₂ HU-308 (5 mg·kg⁻¹), a los ratones lesionados unilateralmente con LPS durante 14 días, se pudo observar mediante inmunotinción que los ratones tratados con los cannabinoides, conservaban una mayor densidad de neuronas TH-positivas (Figura 35), demostrando así que los agonistas CB₂ HU-308 y Δ⁹-THCV tienen propiedades neuroprotectoras en este modelo inflamatorio.

También investigamos el efecto de ambos agonistas CB₂ sobre algunos marcadores biomoleculares indicativos de procesos inflamatorios, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia para CD68 en el estriado. Confirmamos que el tratamiento con el compuesto HU-308 redujo la activación microglial provocada por el LPS. El grupo tratado con el compuesto Δ⁹-THCV no mostró diferencias significativas con el grupo tratado con vehículo (Figura 36), aunque sí pierde un grado de significancia estadística cuando se comparan estos dos grupos con respecto al sham. La implicación del receptor CB₂ en estos procesos queda demostrada gracias a estos resultados y los del Diseño I, pero sobre todo por el hecho de que cuando el tratamiento con HU-308 se realiza sobre los ratones CB₂^{-/-} lesionados con LPS, los efectos sobre la activación glial desaparece completamente (Figura 37).

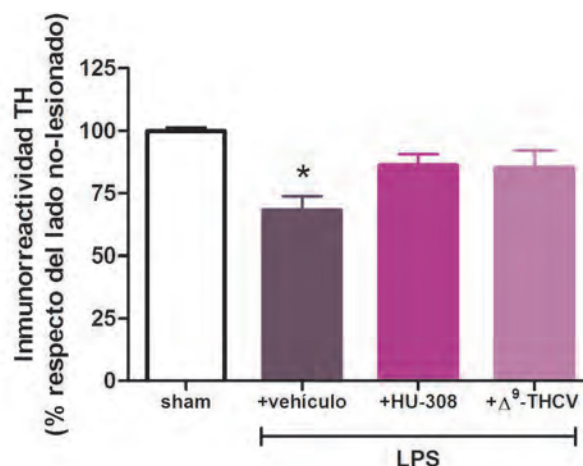


Figura 35. Cuantificación de la inmunofluorescencia para TH en la sustancia nigra de ratones lesionados unilateralmente con LPS o sham y sujetos a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹), HU-308 (5 mg·kg⁻¹) o vehículo. Los valores son medias ± SEM (n= 5-6 animales por grupo) y están expresados en % de inmunorreactividad en el lado lesionado frente al lado no-lesionado en el mismo animal. Los datos se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Student-Newman-Keuls (*p<0.05 vs. sham).

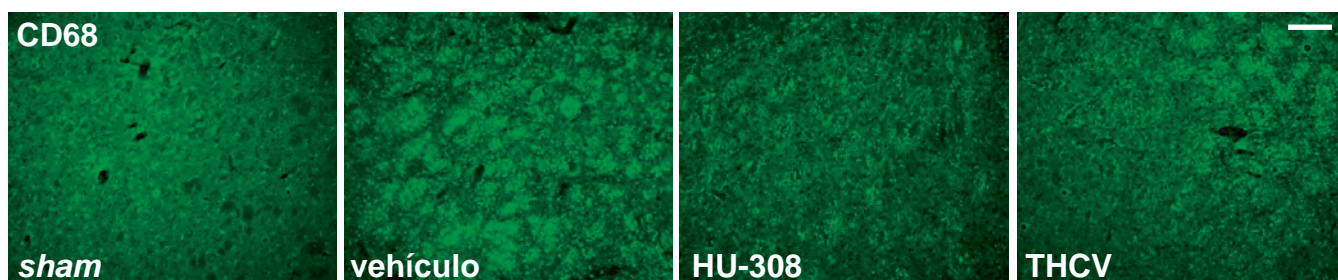
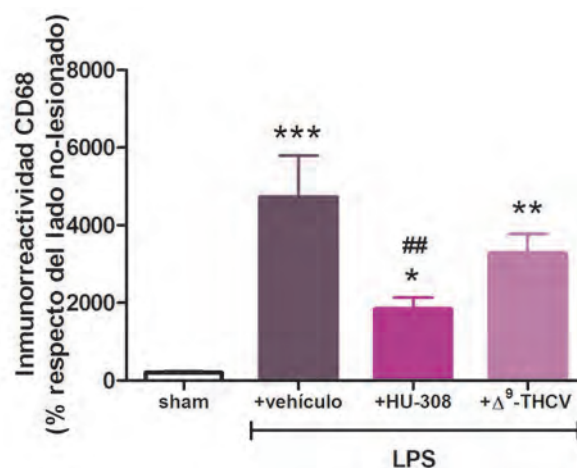


Figura 36. Cuantificación de la densidad de marcaje de la inmunohistoquímica para CD68 en el estriado de ratones lesionados con LPS o sham y sujetos a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹), HU-308 (5 mg·kg⁻¹) o vehículo, con sus correspondientes microfotografías representativas en los paneles inferiores (barra de escala =25 μm). Los valores corresponden a % sobre lado no-lesionado y están expresados como medias ± SEM (n = 6-8 animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. sham; ###p<0.01 vs. vehículo).

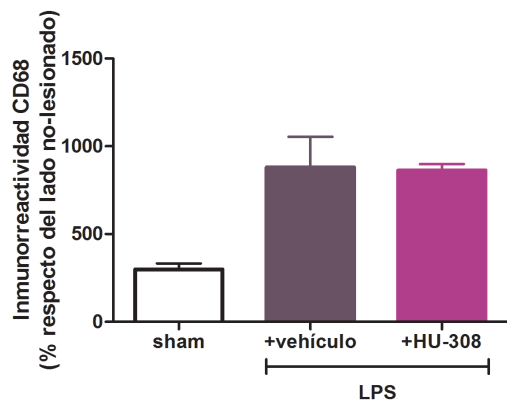
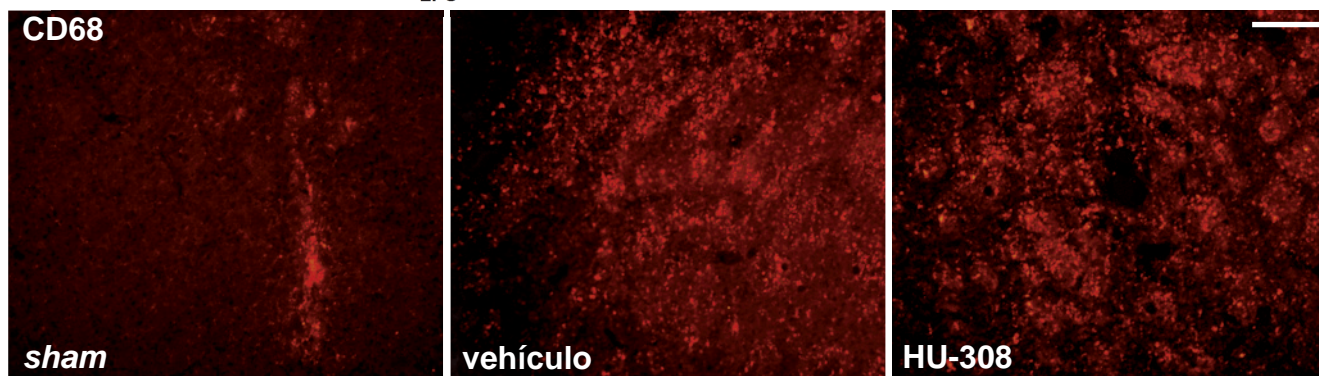


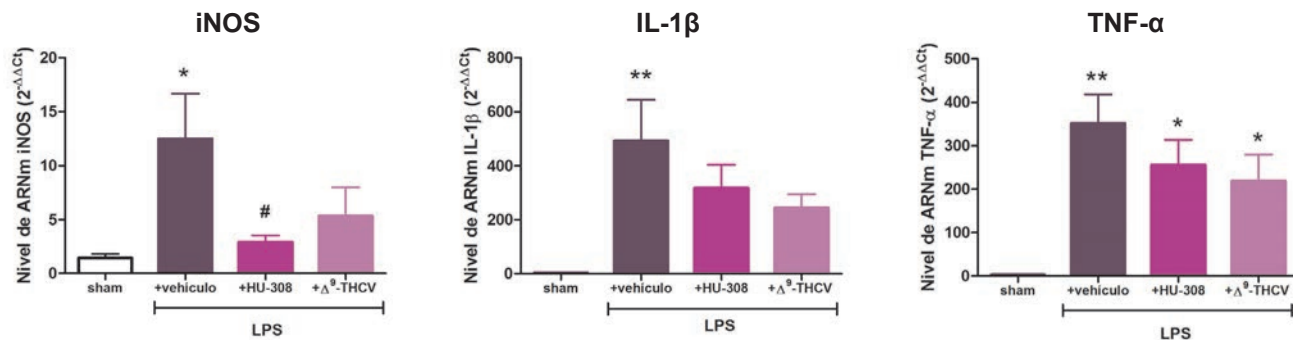
Figura 37. Cuantificación de la densidad de marcaje de la inmunohistoquímica para CD68 en el estriado de ratones $CB_2^{-/-}$ lesionados con LPS o sham y sujetos a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con HU-308 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o vehículo, con sus correspondientes microfotografías representativas en los paneles inferiores (barra de escala = $25 \mu\text{m}$). Los valores corresponden a % sobre lado no-lesionado y están expresados como medias \pm SEM ($n = 4-7$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$).



Para profundizar en el efecto del tratamiento con agonistas CB_2 sobre la inflamación que se produce en este modelo (Oh *et al.*, 2010), se estudió la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α , y la enzima iNOS, presente en microglía, mediante qRT-PCR (Liberatore *et al.*, 1999, Arimoto y Bing, 2003), que encontramos elevadas en el estriado

(Figura 38B). La administración de HU-308, redujo la expresión de iNOS en el estriado, y en menor medida, en la sustancia *nigra* (Figura 38B). La administración de HU-308, redujo la expresión de iNOS en el estriado (Figura 38A), pero no en sustancia *nigra* (Figura 38B; donde sólo se evaluó la acción de HU-308 y no la de Δ^9 -THCV), presumiblemente debido a

A Estriado



B Sustancia nigra

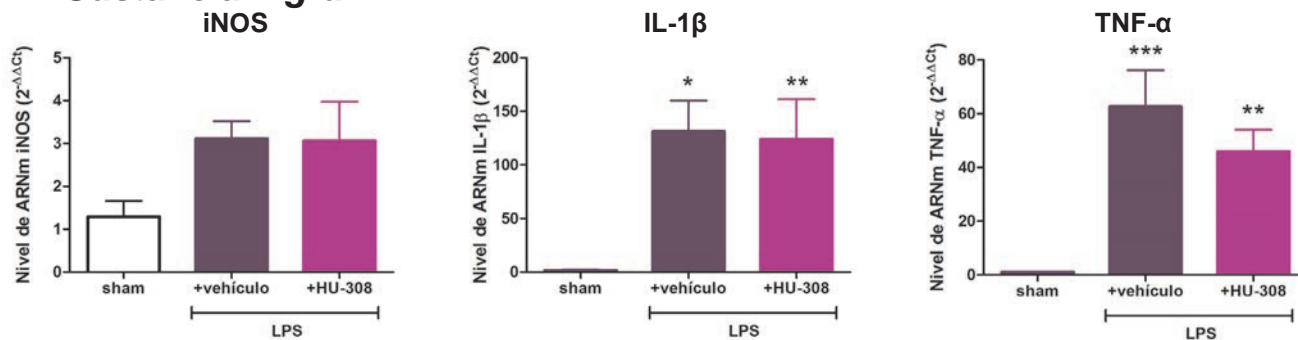


Figura 38. Niveles de expresión de ARNm para la enzima iNOS y las citoquinas IL-1 β y TNF- α medidos mediante qRT-PCR en el estriado (A) y sustancia nigra (B) de ratones lesionados con LPS o sham y sujetos a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con HU-308 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o vehículo. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=5$ animales por grupo) y están sujetos al test del análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sham; # $p < 0.05$ vs. vehículo).

que la inducción de esta enzima por la toxina, en este área cerebral, resultó ser pequeña y estadísticamente no significativa ($F(2,20) = 3.384$, $p = 0.06$). El tratamiento con HU-308 también mostró cierta capacidad de reducir las dos citoquinas estudiadas en el estriado. La administración de Δ^9 -THCV también redujo la expresión de la enzima iNOS en el estriado y mostró una tendencia similar al HU-308 para disminuir ambas citoquinas (Figura 38A)

Neuroprotección con Δ^9 -THCV en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina

En un siguiente paso, y dado que Δ^9 -THCV es antioxidante además de agonista CB_2 , quisimos investigar si también era activo en el modelo de lesión con 6-OHDA, que ya se ha mencionado que es poco inflamatorio y más dependiente de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. En este caso, utilizamos CBD-BDS como control positivo, con el cual ya se habían demostrado sus efectos neuroprotectores y antioxidantes en este modelo (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007).

En la Figura 39 se muestran los efectos del tratamiento crónico con Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y con CBD-BDS (equivalente a $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

en la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales inducida por la lesión i.c.v. con 6-OHDA. Tras la administración crónica de Δ^9 -THCV, la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales se ve reducida, aunque a menor escala que tras el tratamiento crónico con CBD-BDS.

El fitocannabinoide Δ^9 -THCV también redujo la activación microglial que se produce como respuesta a la muerte neuronal causada por 6-OHDA en la sustancia *nigra* (Figura 40) a pesar de que éste es un modelo con poca respuesta inflamatoria y además, producida de manera secundaria y visible solo a nivel local. Sus efectos, no obstante, fueron menores que los del tratamiento con CBD-BDS.

Asumimos que los efectos de Δ^9 -THCV sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas y la activación microglial en la sustancia *nigra* son comparables a los efectos del CBD-BDS, provocados en ambos casos por mecanismos de acción independientes de los receptores CB_1 y CB_2 , estando justificado por sus propiedades antioxidantes, en concordancia con datos previos ya mencionados, obtenidos con CBD puro (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007).

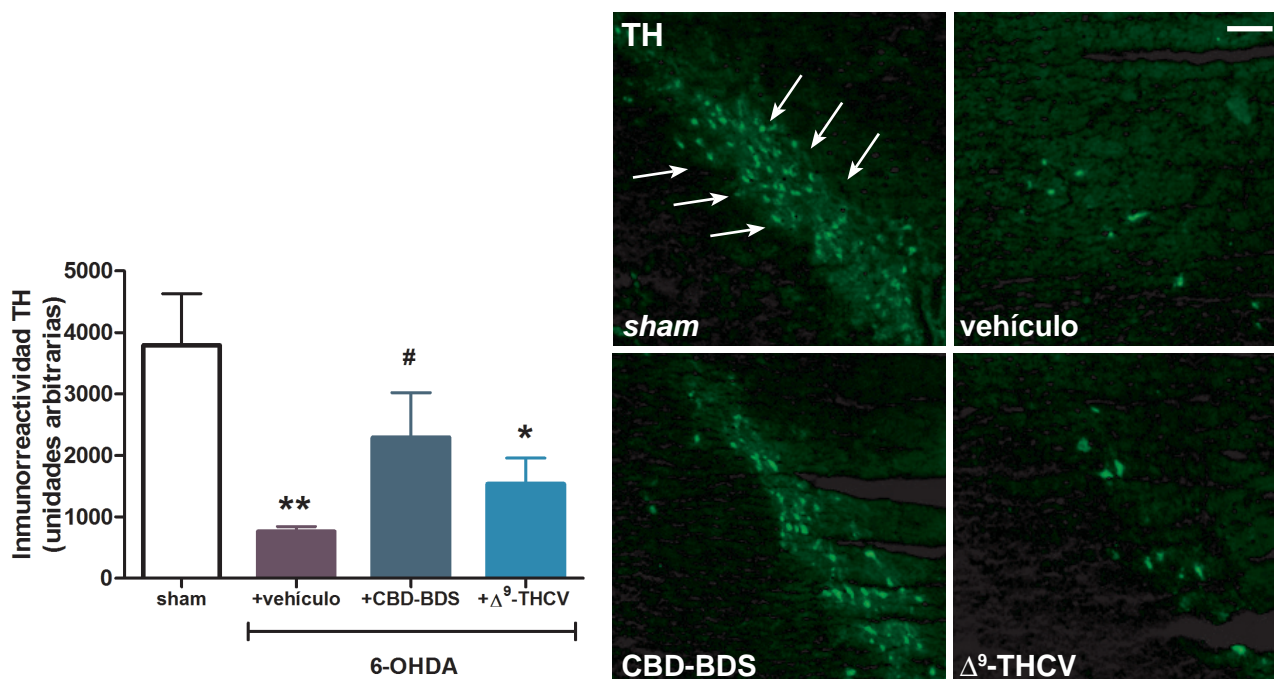


Figura 39. Inmunohistoquímica para TH en la sustancia nigra de ratas lesionadas con 6-OHDA i.c.v. o sham y sujetas a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), CBD-BDS ($4.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, equivalente a $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de CBD puro) o vehículo, con sus correspondientes microfotografías representativas (barra de escala = $100 \mu\text{m}$). Los valores son medias \pm SEM ($n = 5-6$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. controles; # $p < 0.05$ vs. animales tratados con vehículo).

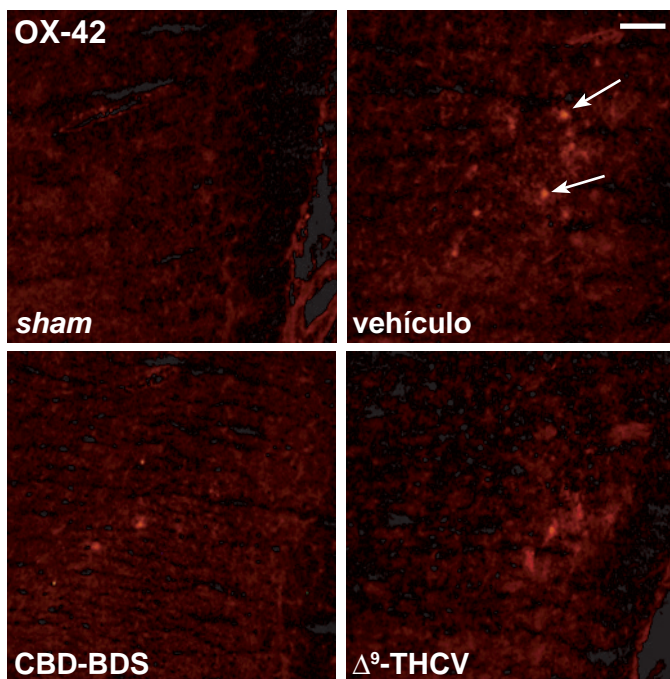
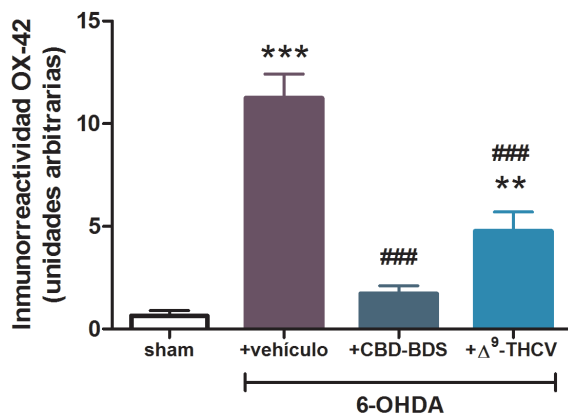


Figura 40. Inmunohistoquímica para OX-42 en la sustancia nigra de ratas lesionadas con 6-OHDA i.c.v. o sham y sujetas a tratamiento crónico (14 días; i.p.) con Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹), CBD-BDS (4,63 mg·kg⁻¹, equivalente a 3 mg·kg⁻¹ de CBD puro) o vehículo y sus correspondientes microfotografías representativas (barra de escala = 50 μ m), las flechas indican células OX-42-positivas. Los valores son medias \pm SEM (n = 5-6 animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (**p<0.01, ***p<0.001 vs. controles; ###p<0.001 vs. animales tratados con vehículo).

Neuroprotección con derivados cannabinoides activos sobre PPAR γ

Siguiendo con la idea de buscar una polivalencia en el tratamiento con cannabinoides en la EP, a las posibilidades de neuroprotección derivadas de la activación del receptor CB₂ y de las propiedades antioxidantes del Δ^9 -THCV, quisimos aunar la posibilidad de un efecto mediado por la activación de los receptores PPAR γ . Ligandos de este receptor nuclear se sabe que son neuroprotectores en modelos experimentales de la EP (Bright *et al.*, 2008), y de forma reciente se ha propuesto que ciertos cannabinoides tienen actividad sobre estos receptores (Mestre *et al.*, 2009, O'Sullivan y Kendall, 2010). Para ello, utilizamos VCE-003.2, un derivado del fitocannabinoide no-psicotrópico CBG, desarrollado por VivaCell Biotechnology. Este compuesto es un derivado quinona del CBG con un grupo etilamina en la posición 2 del anillo [1,4]benzoquinona. Se le ha investigado por su posible afinidad por los receptores CB₁ y CB₂, pero su unión se encuentra en el rango micromolar (K_i >40 μ M), por lo que se considera que no tiene suficiente afinidad por ninguno de los dos receptores, pero sí posee una importante actividad como ligando PPAR γ (K_i =1.2 μ M; Díaz-Alonso *et al.*, 2016).

Se utilizaron ratones lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA que recibieron un tratamiento crónico durante 7 días con el agonista PPAR γ VCE-003.2 (10 mg·kg⁻¹, i.p.). En la Figura 41 podemos observar cómo los ratones que recibieron el compuesto presentan mejor coordinación en el rotarod que sus hermanos tratados con vehículo, aunque la diferencia no alcanza la significación estadística. La disminución de los síntomas de parkinsonismo se hace más tangible al estudiar el comportamiento motor de estos ratones en el actímetro, que nos permite observar que los ratones que recibieron el agonista PPAR γ tienen mejor respuesta en índices como ambulación, velocidad media, tiempo de reposo o número de veces que el animal se levanta, llegando a los niveles de sus hermanos con lesión simulada.

A continuación investigamos si esta mejoría motora se debía a un aumento de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra mediante técnicas inmunohistoquímicas. Tras la cuantificación de las células TH-positivas (Figura 42A), observamos que los ratones que recibieron tratamiento presentaban una mayor población de este tipo neuronal que sus hermanos tratados con vehículo, aunque no llegaba a los niveles de los ratones sham. En cualquier caso, la recuperación fue pequeña en la medida que el daño en forma de reducción

de neuronas TH-positivas fue también pequeño en este experimento a pesar de las evidentes alteraciones a nivel motor (Figura 41)

La falta de una importante lesión nigroestriatal en este experimento también fue evidente cuando se llevó a cabo la cuantificación de la inmunotinción para CD68 (Figura 42B), ya

que no se observaron ni una elevación de la inmunorreactividad para CD68 tras la lesión, ni tampoco una disminución significativa de este marcador en los ratones que habían sido tratados con VCE-003.2, en concordancia por el bajo perfil inflamatorio de este modelo. Por lo tanto, podemos confirmar que el

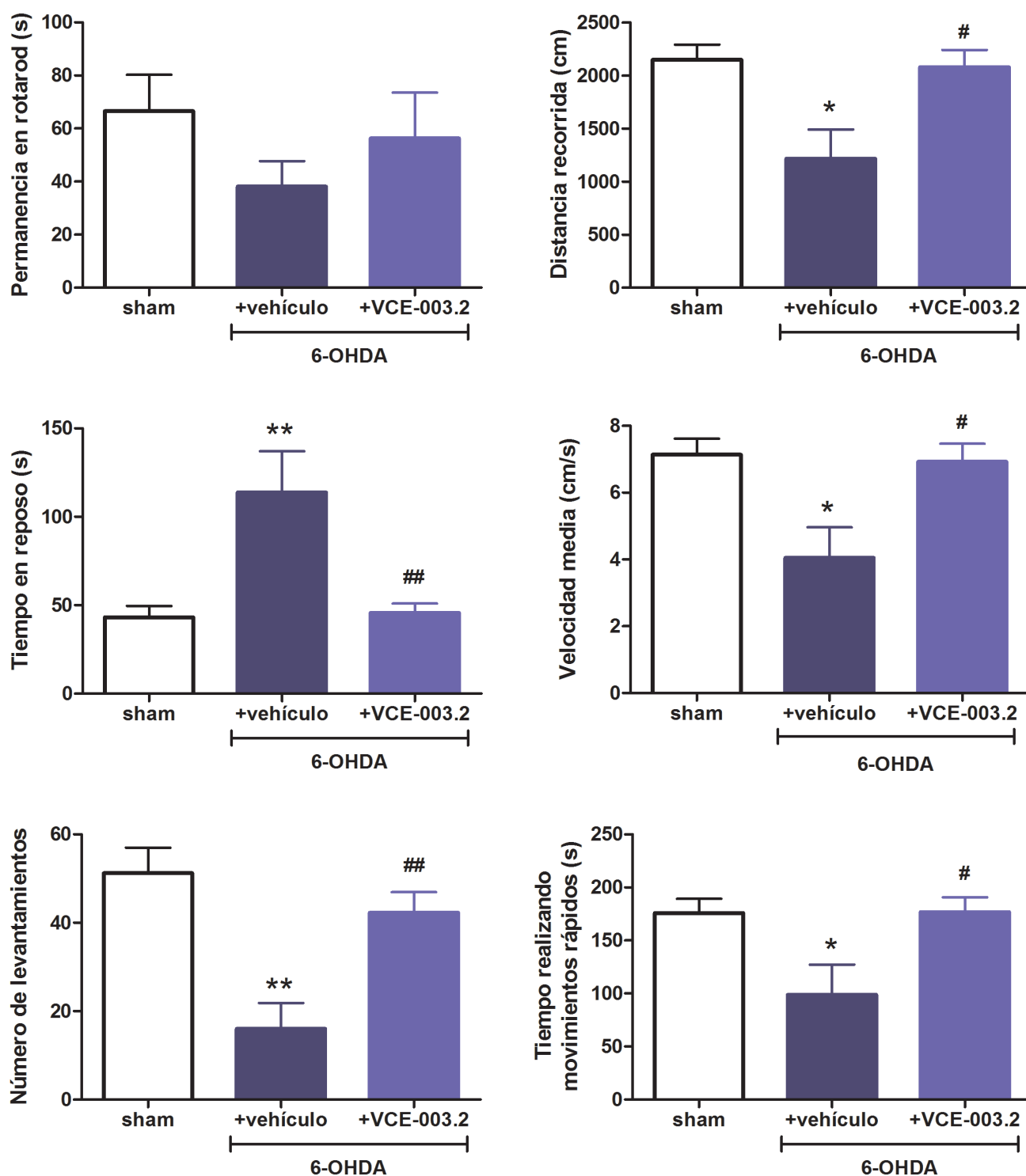
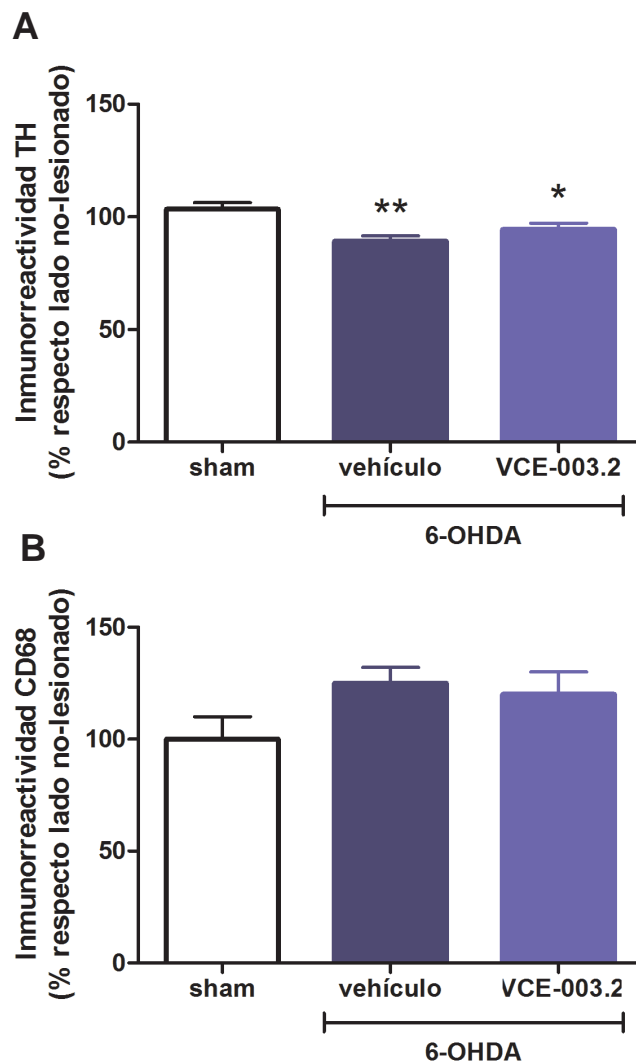


Figura 41. Análisis de diferentes parámetros motores mediante los test de Rotarod y actímetro en ratones sham y lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA y tratados diariamente durante 7 días con VCE-003.2 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o vehículo (DMSO:Tween80:BSA). Los datos se representan como media \pm SEM ($n=5$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del Student-Newman-Keuls test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ respecto de sham; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ respecto de vehículo).

compuesto VCE-003.2 confiere cierto grado de neuroprotección, aunque sus efectos fueron pequeños y posiblemente relacionados con sus propiedades antioxidantes, ya que en este modelo de lesión con 6-OHDA, los efectos de los diferentes cannabinoides investigados (Δ^9 -THC, CBD, Δ^9 -THCV) han indicado un efecto antioxidante independiente de receptores CB₁/CB₂. No podemos confirmar la implicación de efectos antiinflamatorios dada la modesta activación microglial encontrada en esta lesión. Se necesitarían, no obstante, nuevos estudios para confirmar el posible mecanismo implicado con la posibilidad abierta de implicar a los receptores PPAR γ de los que el VCE003.2 parece ser buen ligando.

Figura 42. Cuantificación de la inmunotinción de TH (A) y CD68 (B) medida en la sustancia nigra de ratones sham y lesionados intraestriatalmente con 6-OHDA y tratados diariamente durante 7 días con VCE-003.2 (10 mg·kg⁻¹) o vehículo (DMSO:Tween80:BSA). Los valores son medias \pm SEM (n= 5 ratones por grupo) y están expresados en % de inmunorreactividad en el lado lesionado frente al lado no-lesionado en el mismo animal. Los datos se sometieron al análisis de la varianza ANOVA de una vía seguido del Student-Newman-Keuls test (*p<0.05, **p<0.01).



Efecto de antagonistas CB₁ sobre algunos síntomas de la Enfermedad de Parkinson

Aunque el objetivo principal de los estudios farmacológicos de esta Tesis Doctoral era investigar un posible tratamiento neuroprotector en modelos experimentales de EP, se ha comentado anteriormente que también quisimos investigar el valor de este posible tratamiento a nivel sintomatológico. Esta hipótesis deriva de los datos obtenidos con Δ^9 -THC en modelos preclínicos de la EP en los que se ha visto que es neuroprotector (Lastres-Becker *et al.*, 2005), pero que agravaría la bradiquinesia de forma aguda por su agonismo CB₁. Δ^9 -THCV es capaz de reproducir los efectos neuroprotectores del Δ^9 -THC, y además tiene un especial interés debido a su capacidad como antagonista CB₁, por lo que podría tener los efectos sintomáticos observados con el antagonista CB₁ rimonabant (González *et al.*, 2006). En este bloque de experimentos nos propusimos investigar su posible efecto beneficioso sobre los síntomas.

Evaluación de la capacidad antagonista CB₁ de Δ^9 -THCV in vivo

Antes de comprobar el efecto del fitocannabinoide Δ^9 -THCV sobre los síntomas de aquinesia (inhibición motora) en un modelo experimental de EP, quisimos confirmar las propiedades farmacológicas del compuesto analizando si Δ^9 -THCV a la dosis de 2 mg·kg⁻¹ se comporta *in vivo* como antagonista de los receptores CB₁, usando ratas, al igual que otros autores lo habían demostrado en ratones (Pertwee *et al.*, 2007, Bolognini *et al.*, 2010).

Es habitual que para demostrar que un cannabinoide es agonista/antagonista CB₁, se analicen en animales de laboratorio comportamientos típicos de la llamada *tétrada cannabinoide* como son la analgesia y la hipoquinesia.

Para esta validación, se estudió el efecto de una dosis de 2 mg·kg⁻¹ de Δ^9 -THCV frente a los efectos hipoquinéticos y analgésicos del potente agonista cannabinoide CP 55,940 (0.1 mg·kg⁻¹). Se observó que el fitocannabinoide atenuaba

parcialmente tanto la respuesta hipoquinética como la respuesta analgésica del CP 55,940 (Para esta validación, se estudió el efecto de una dosis de $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Δ^9 -THCV frente a los efectos hipoquinéticos y analgésicos del potente agonista cannabinoide CP 55,940 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Se observó que el fitocannabinoide atenúa parcialmente tanto la respuesta hipoquinética como la respuesta analgésica del CP 55,940 (Figura 43A). Por ejemplo, vimos que el Δ^9 -THCV era capaz de aumentar la distancia recorrida en el actímetro por los animales que reciben conjuntamente Δ^9 -THCV y el agonista, frente a los ratones tratados sólo con CP 55,940. Cuando se realizó la prueba de la placa caliente, Δ^9 -THCV también disminuyó la analgesia provocada por el CP 55,940, disminuyendo el tiempo que tardaban los animales en responder al estímulo doloroso cuando se administraban los dos compuestos conjuntamente (Figura 43B). Estos resultados demuestran que Δ^9 -THCV se comporta en ratas como antagonista del receptor CB_1 a la dosis de $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Efecto de Δ^9 -THCV en la inhibición motora y sobre los niveles de dopamina y glutamato en ratas lesionadas con 6-hidroxidopamina

Una vez confirmado que Δ^9 -THCV actuaba como antagonista de los receptores CB_1 a dosis bajas, el siguiente paso fue estudiar su efecto sobre los síntomas de inhibición motora en el modelo de ratas lesionadas con 6-OHDA. Con este fin, sometimos a las ratas lesionadas con 6-OHDA i.c.v. a una única inyección de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y se compararon sus efectos con el antagonista CB_1 rimonabant ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) utilizado como control positivo ya que sus efectos sobre la inhibición motora ya habían sido estudiados en este modelo experimental de EP (González *et al.*, 2006). En la Figura 44 se puede observar que 14 días después de la lesión aparecen anomalías motoras compatibles con una situación hipoquinética (menor ambulación, menor velocidad de marcha y más movimientos lentos que rápidos) y que éstas se ven atenuadas con el efecto agudo tanto de Δ^9 -THCV como rimonabant, que fueron igualmente efectivos en el aumento de la distancia recorrida [$F(3,18) = 4.14$, $p < 0.05$], el aumento de la velocidad media [$F(3,18) = 4.22$, $p < 0.05$], la disminución del tiempo empleado en movimientos lentos [$F(3,21) = 3.037$, $p < 0.05$] y, en menor medida, en el aumento del tiempo empleado en movimientos rápidos [$F(3,19) = 1.992$, $p = 0.156$], alcanzando

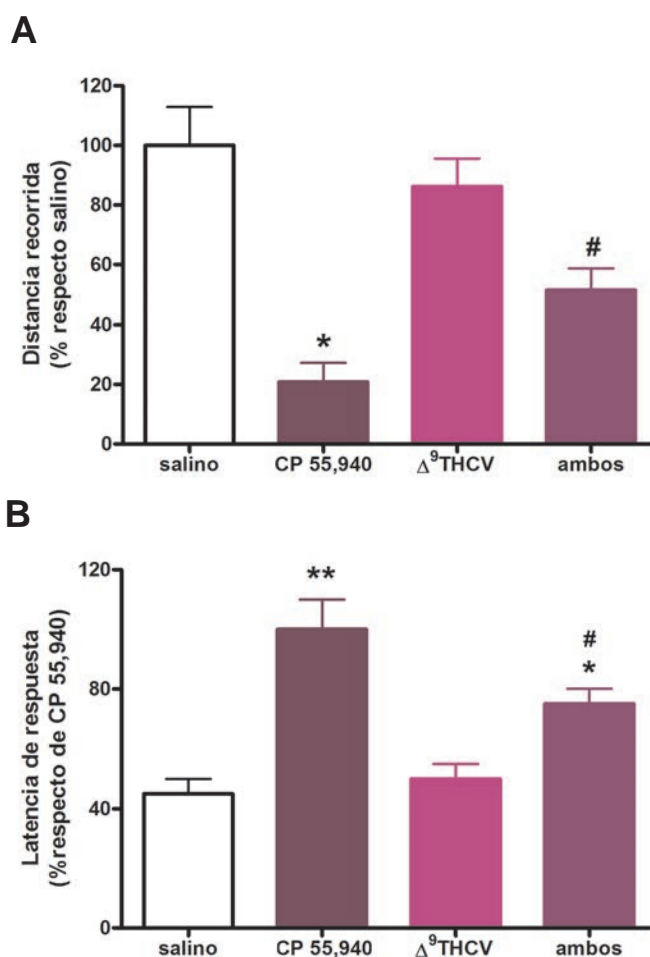


Figura 43. Efecto de una inyección i.p. aguda de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) sobre la inhibición motora (A) y la analgesia (B) inducidas por CP 55,940 en ratas naïve. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n = 5-6$ animales por grupo) y fueron normalizados con respecto al grupo que tiene la máxima respuesta. Los datos están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control y animales tratados con Δ^9 -THCV; # $p < 0.05$ vs. animales tratados con CP 55,940). $F(3,21) = 7.983$, $p < 0.005$; para la ambulación y $F(3,22) = 13.84$, $p < 0.001$; para la prueba de la placa caliente.

en todos los casos valores similares a los exhibidos por los animales *sham*.

Como era de esperar, el análisis neuroquímico de los ganglios basales de estos animales confirmó que las anomalías motoras evidentes tras la lesión estaban asociadas a una disminución significativa del contenido en DA estriatal, signo clásico del parkinsonismo. Para comprobar si Δ^9 -THCV mejoraba los síntomas motores mediante un aumento de este neurotransmisor, cuantificamos los niveles de DA estriales mediante HPLC y observamos que éstos no se modificaban como se puede observar en la Figura 45, sugiriendo que la mejoría en los síntomas no era dependiente de DA, sino de la actividad de algún otro neurotransmisor capaz de compensar la consecuencia motora del déficit de DA.

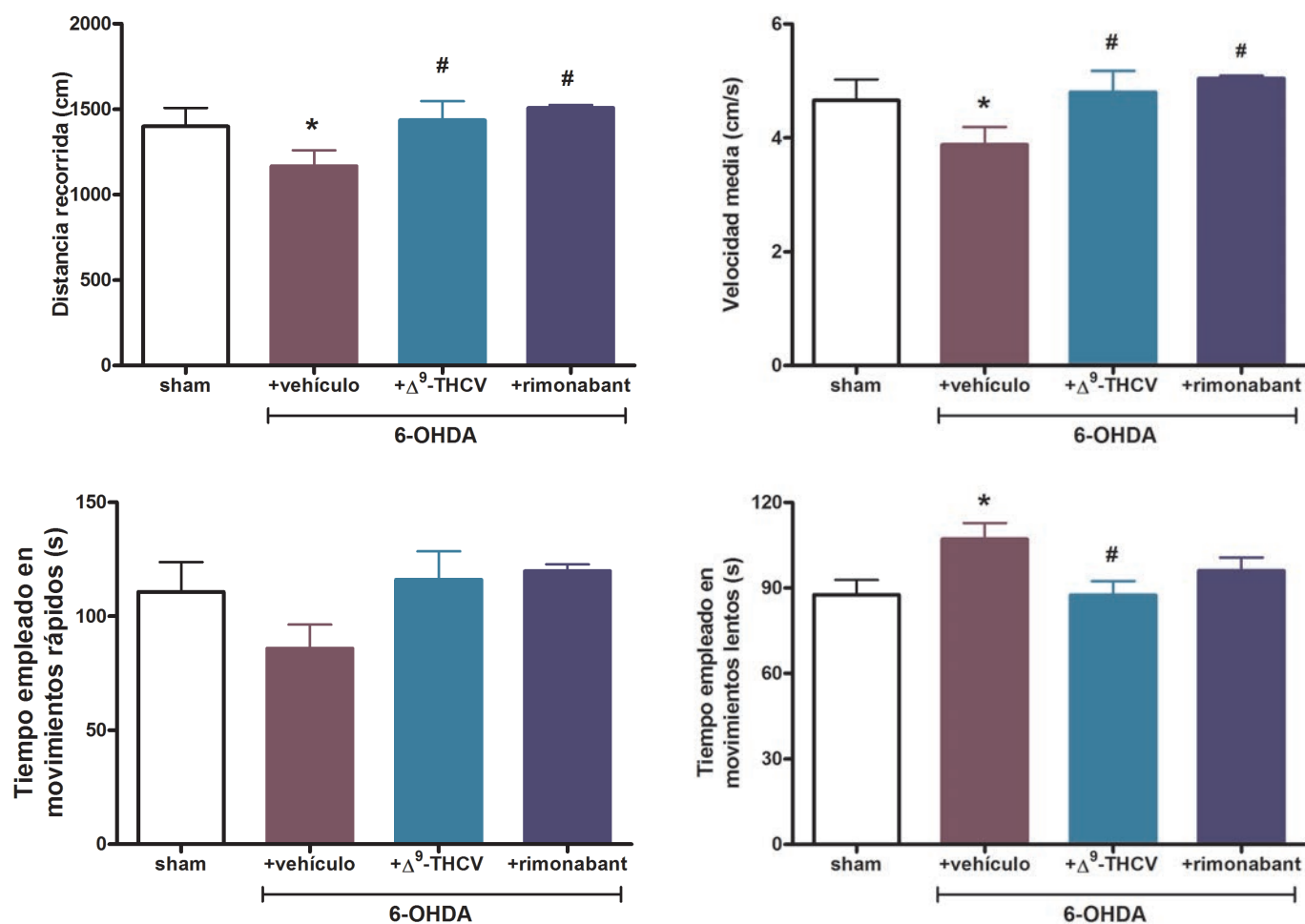


Figura 44. Parámetros motores medidos en ratas lesionadas i.c.v. con 6-OHDA y sham sometidas a una única inyección i.p. de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), rimonabant ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o vehículo dos semanas después de la lesión. Los valores se representan como medias \pm SEM ($n = 5-6$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs. controles; # $p < 0.05$ frente a las ratas lesionadas con 6-OHDA).

Nos centramos en el glutamato por datos obtenidos previamente en nuestro grupo mediante microdiálisis (García-Arencibia *et al.*, 2008), y cuando cuantificamos su contenido en diferentes estructuras de los ganglios basales, encontramos que el Δ^9 -THCV tiende a aumentar los niveles de este neurotransmisor en el estriado, así como a provocar una reducción significativa en la sustancia *nigra* (Figura 46). Es importante indicar que ambas estructuras de los ganglios basales reciben innervación glutamatérgica procedente de terminales corticoestriales, en el caso del estriado, y subtalamocorticales, en el caso de la sustancia *nigra*.

Por lo tanto, el efecto de una única inyección de Δ^9 -THCV sobre el comportamiento motor no parece estar asociado a un aumento del contenido de DA en el estriado, sino a cambios en la actividad glutamatérgica tanto en el estriado como en la sustancia *nigra*.

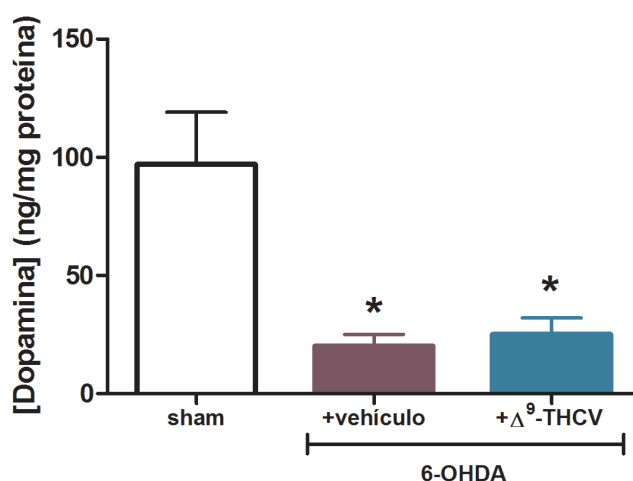
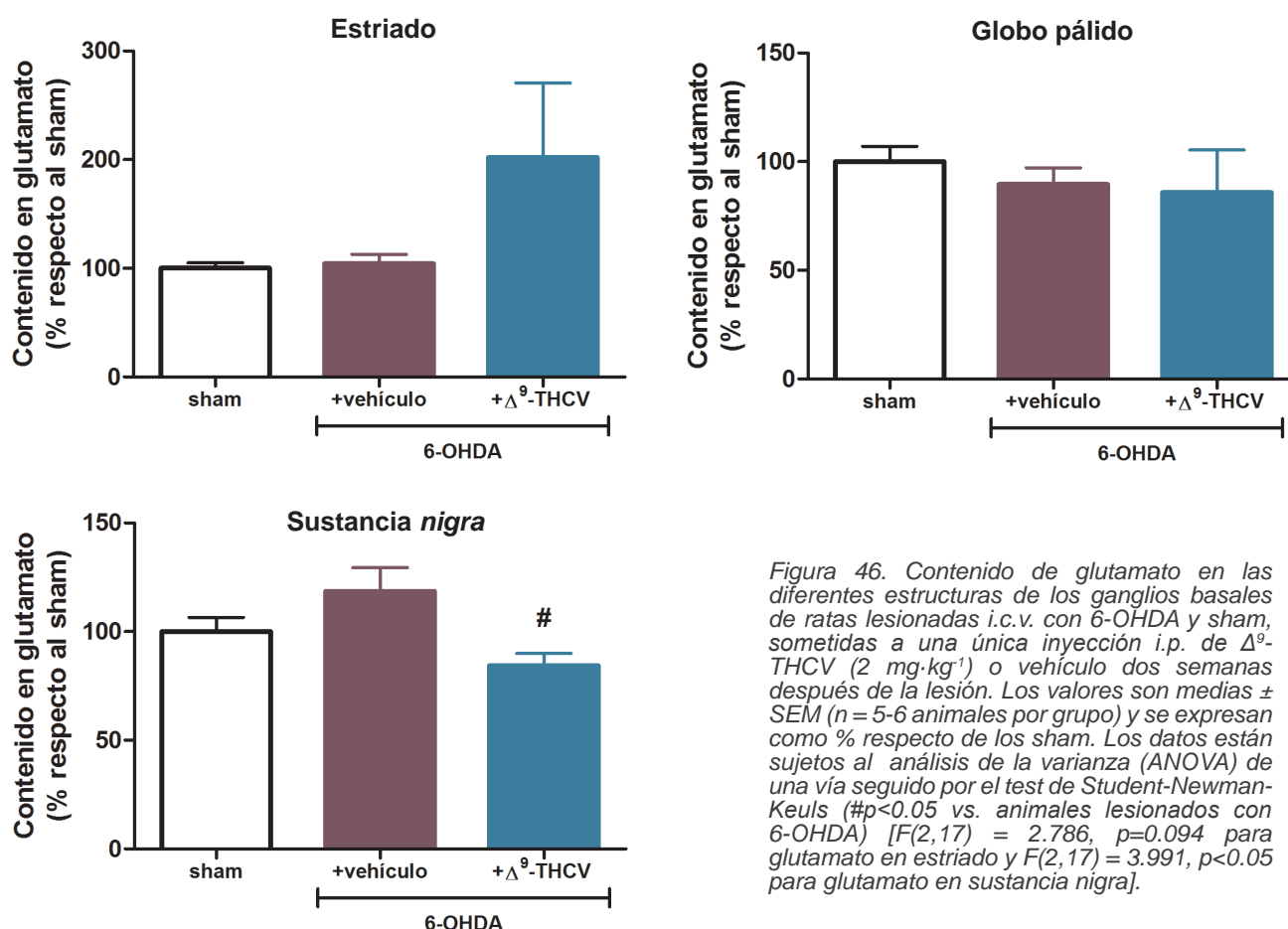


Figura 45. Contenido de dopamina en el estriado de ratas lesionadas i.c.v. con 6-OHDA y sham, y sometidas a una sola inyección i.p. de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o vehículo dos semanas más tarde. Los valores se representan como medias \pm SEM ($n = 5-6$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido por el test de Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$ vs. controles).



Efecto de Δ⁹-THCV sobre la disquinesia asociada a levodopa en el modelo de ratones *aphakia*

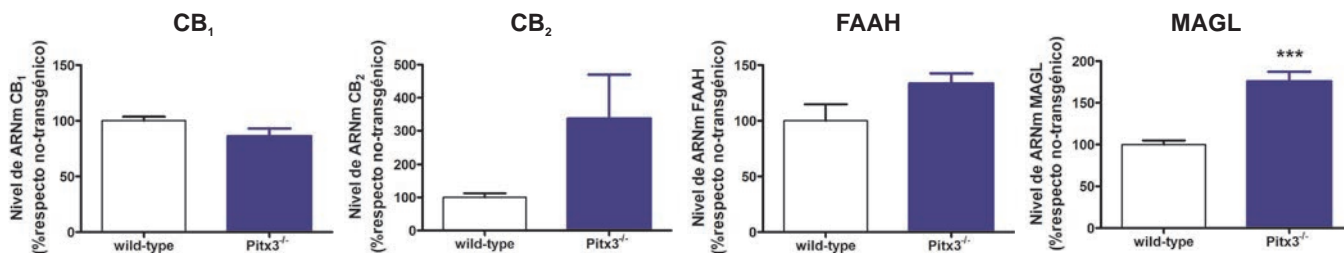
El último bloque de experimentos de la parte farmacológica pretendía dar un nuevo paso en la definición de un tratamiento cannabinoide polivalente en la EP, investigando si el Δ⁹-THCV podía servir también para atenuar la disquinesia inducida por levodopa, propiedad que se sumaría a las estudiadas en los experimentos anteriores en cuanto a sus efectos neuroprotectores por activación de los receptores CB₂ y por sus efectos antioxidantes independientes de receptores CB₁ y CB₂ (quizá vía PPARγ como el VCE-003.2), y su capacidad de reducir de manera puntual la hipoquinesia a través del bloqueo del receptor CB₁. Para ello, se utilizaron ratones deficitarios en la proteína Pitx3, que desarrollan una pérdida bilateral de neuronas dopaminérgicas (Hwang *et al.*, 2003) y mimetizan los síntomas que sufren los humanos tras el tratamiento crónico con L-DOPA (Ding *et al.*, 2007, Li y Zhou, 2013). Este modelo de Parkinson genético *aphakia* es utilizado con frecuencia como herramienta para el estudio de la disquinesia asociada a levodopa.

Determinamos en estos ratones si el Δ⁹-THCV administrado en combinación con L-DOPA podría disminuir o retrasar la aparición de los efectos disquinéticos clásicos de la terapia continuada de reemplazo dopaminérgico.

Evaluación del Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones Pitx3^{-/-}

Como paso previo al estudio farmacológico del Δ⁹-THCV sobre la disquinesia inducida por levodopa, quisimos conocer el estado de algunos elementos clave del Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones *aphakia* mediante qRT-PCR. Esto podría servir, en caso de diferencias marcadas, para optimizar el tratamiento cannabinoide en este modelo y predecir los posibles efectos. No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de los receptores CB₁ y CB₂ o de la enzima FAAH en ninguna de las estructuras estudiadas, sustancia *nigra* y estriado. Únicamente aparece un aumento de la expresión de MAGL en el estriado de los ratones Pitx3^{-/-} con respecto a sus hermanos *wild-type*, como se puede ver en la Figura 47.

A Estriado



B Sustancia nigra

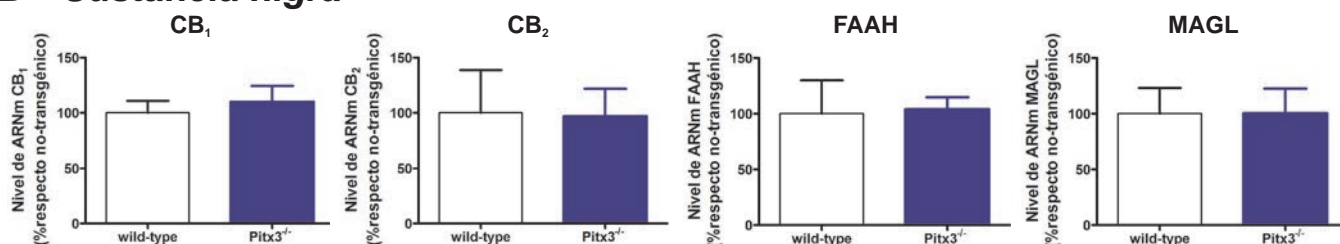


Figura 47. Niveles de expresión de ARNm para los receptores cannabinoides de tipo 1 y 2 y las enzimas de degradación FAAH y MAGL, medidos por qRT-PCR en el estriado (A) y sustancia nigra (B) de ratones Pitx3^{-/-} y wild-type. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=6$ animales por grupo) y están sujetos al test de la t de Student (** $p<0.001$).

Efecto de Δ^9 -THCV sobre la aparición y evolución de la disquinesia asociada a levodopa

Los síntomas disquinéticos que desarrollan los ratones Pitx3^{-/-} tras la administración crónica de L-DOPA incluyen movimientos involuntarios anómalos (AIM) caracterizados por saltos sobre las patas traseras, y movimientos repetitivos de tres y cuatro patas. Los AIM aparecen tras la primera inyección de L-DOPA y aumentan su frecuencia durante la primera semana, manteniéndose estables posteriormente. En este experimento sólo se cuantificaron los AIM de tres y cuatro patas, por ser más restrictivos (Ding *et al.*, 2011), medidos a los 30 minutos, cerca del primer máximo de actividad disquinética, y a los 60 minutos después de la administración de la L-DOPA.

El primer día de tratamiento se midió el efecto agudo de Δ^9 -THCV sobre los AIM a los 30 y 60 minutos tras la administración de la L-DOPA (Figura 48) y observamos que el cannabinoide reducía, aunque no significativamente por la elevada variabilidad, sobre todo del grupo tratado exclusivamente con L-DOPA, el tiempo que estos ratones estaban realizando movimientos estereotipados.

Cuando los ratones Pitx3^{-/-} son sometidos a un tratamiento diario con Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹, i.p.) en ausencia de L-DOPA no desarrollan AIM, como se puede observar en la Figura 49A. Por lo tanto, podemos deducir que Δ^9 -THCV no produce disquinesia *per se*. Además, en esta misma figura podemos observar que a partir del quinto día, la administración conjunta de L-DOPA (10 mg·kg⁻¹, i.p.) y Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹, i.p.; 10 minutos después de L-DOPA) reduce

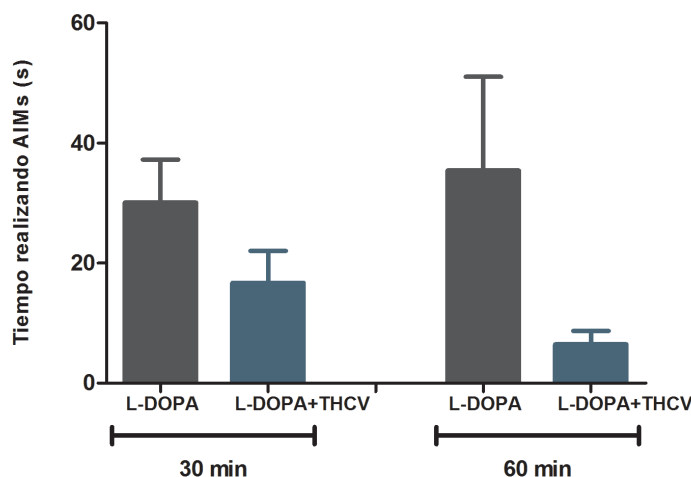


Figura 48. Efecto del co-tratamiento agudo de Δ^9 -THCV con L-DOPA sobre las disquinesias el primer día de tratamiento, 30 y 60 minutos después de la inyección de L-DOPA. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=10-19$ animales por grupo) y están sujetos al test de la t de Student ($p<0.05$).

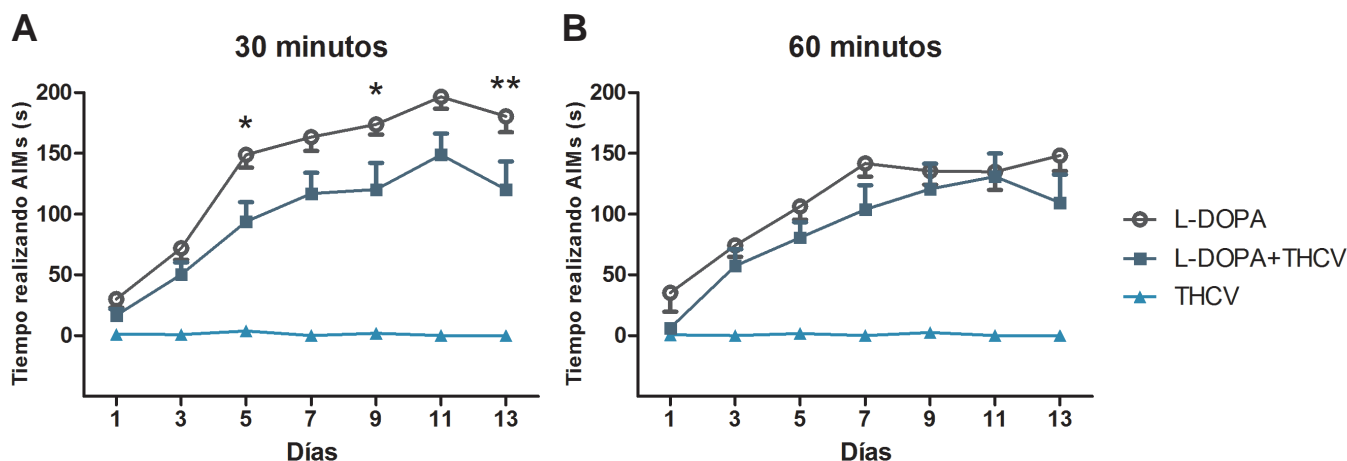


Figura 49. Cuantificación del tiempo empleado por los ratones *Pitx3^{-/-}* en realizar los movimientos involuntarios anómalos desarrollados 30 (A) y 60 (B) minutos después de la inyección de L-DOPA ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, i.p.) sola, en combinación de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o Δ^9 -THCV solo. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=10-19$ animales por grupo), respecto de los 14 días de tratamiento, y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido del test de Bonferroni (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. L-DOPA).

significativamente la duración de los AIM cuando los medimos a los 30 minutos. Esta diferencia pierde significación estadística cuando tomamos la medida a los 60 minutos (Figura 49B).

El último día de tratamiento se realizó un patrón temporal de actividad como control de la actuación farmacológica de la L-DOPA (Figura 50), donde se puede observar que la disquinesia estuvo presente al menos 20 minutos tras la administración de la L-DOPA y que presenta un máximo de actividad alrededor de los 30 minutos. A partir de ese momento, la actividad de la L-DOPA comienza a disminuir. También en este patrón temporal del último día se observa que la administración de Δ^9 -THCV redujo los AIM provocados por la L-DOPA de forma significativa entre los 40 y los 60 minutos post-tratamiento.

Al medir la coordinación motora mediante el test del rotarod, observamos que los ratones tratados con L-DOPA y L-DOPA+ Δ^9 -THCV no presentaban diferencias significativas

con respecto a la línea basal tras 12 días de tratamiento (Figura 51), momento en que se realizó esta prueba. Como se puede observar, 60 minutos después de la inyección de L-DOPA los ratones que recibieron el tratamiento combinado de L-DOPA+ Δ^9 -THCV realizaron la prueba mejor que el grupo tratado solo con L-DOPA. El grupo control que recibió Δ^9 -THCV de forma individual realizó la prueba mejor que el resto de grupos en todos los casos en concordancia con la idea de que Δ^9 -THCV es un antagonista CB_1 que administrado individualmente puede provocar hiperactividad.

Estudios previos han demostrado que el tratamiento crónico con L-DOPA provoca un aumento de la actividad horizontal (Galter *et al.*, 2010), y en este estudio encontramos que la co-administración de L-DOPA con Δ^9 -THCV disminuía esta hiperactividad horizontal respecto al grupo tratado solo con L-DOPA, mientras que cuando Δ^9 -THCV se administraba solo, no

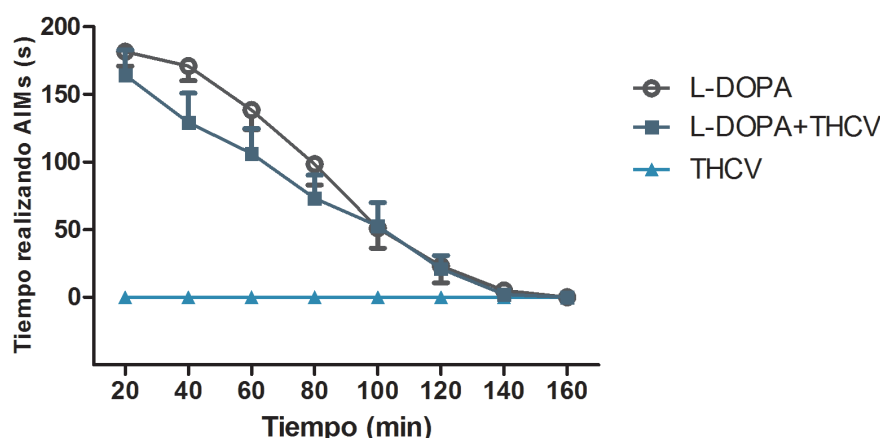


Figura 50. Patrón temporal de actividad sobre los síntomas disquinéticos evaluados el último día de tratamiento, cada 20 minutos hasta 160 minutos después de la administración de la L-DOPA. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=10-19$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido del test de Bonferroni (* $p<0.05$).

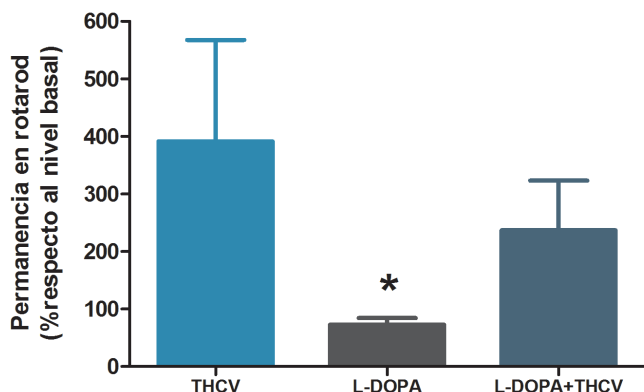


Figura 51. Tiempo de permanencia de los ratones *Pitx3^{-/-}* en el rotarod a los 60 minutos tras la administración durante 12 días de L-DOPA (10 mg·kg⁻¹), Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹) o la combinación de ambos. Los datos se representan como media ± SEM (n= 10-19 animales por grupo) normalizados respecto de la línea basal calculada para cada grupo el primer día y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Student-Newman-Keuls (*p<0.05 respecto a Δ⁹-THCV).

afectaba a los movimientos horizontales (Figura 52A). En cuanto a la actividad vertical, este grupo obtuvo unos valores significativamente mayores que el grupo al que se administró vehículo, en los últimos días del tratamiento. Aun así, el grupo con L-DOPA+Δ⁹-THCV presenta una tendencia a disminuir la actividad vertical típica de la disquinesia (Figura 52B).

Los datos anteriores apoyan la idea de que el Δ⁹-THCV cuando se administra desde el inicio del tratamiento junto con L-DOPA puede prevenir el desarrollo de la disquinesia. A continuación, quisimos saber si también podía ser eficaz reduciendo la disquinesia una vez ésta ya está establecida. Para ello, administramos una única dosis de Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹) a la mitad de los ratones del grupo disquinético el último día de tratamiento tras haber estado recibiendo L-DOPA durante 13 días. Como se puede ver en la Figura 53, los ratones que recibieron la dosis aguda de Δ⁹-THCV muestran una reducción significativa de la duración de los AIM en la medida tomada a los 30 minutos en comparación con el grupo que solo recibe L-DOPA. Pero este efecto no se mantiene durante el registro de comportamiento de los 60 minutos. Sería interesante seguir el desarrollo de este efecto a lo largo de días

posteriores como parte de posibles futuros experimentos.

Por último, intentamos correlacionar los resultados obtenidos a nivel comportamental tras la administración de la L-DOPA de manera individual o combinado con Δ⁹-THCV con los cambios que se pueden detectar a nivel molecular en los ganglios basales, concretamente en el estriado, de estos animales. En primer lugar, nos centramos en la detección de la proteína FosB, que ha sido propuesta como un marcador de aparición de disquinesia, ya que su expresión se ve incrementada en el estriado de los ratones hemiparinsonianos tratados crónicamente con L-DOPA (Pavón *et al.*, 2006). En este experimento, como ya se vio en estudios anteriores (Solís *et al.*, 2015), encontramos que el tratamiento de los ratones *Pitx3^{-/-}* con L-DOPA produjo un aumento significativo de inmunotinción de FosB en el estriado, mientras que el tratamiento con Δ⁹-THCV, no solo no modificó *per se* la expresión de la proteína respecto a los ratones tratados con vehículo (Figura 54) sino que cuando los ratones son tratados con la combinación de L-DOPA y Δ⁹-THCV, el número e intensidad de células FosB-positivas se ven significativamente disminuidos.

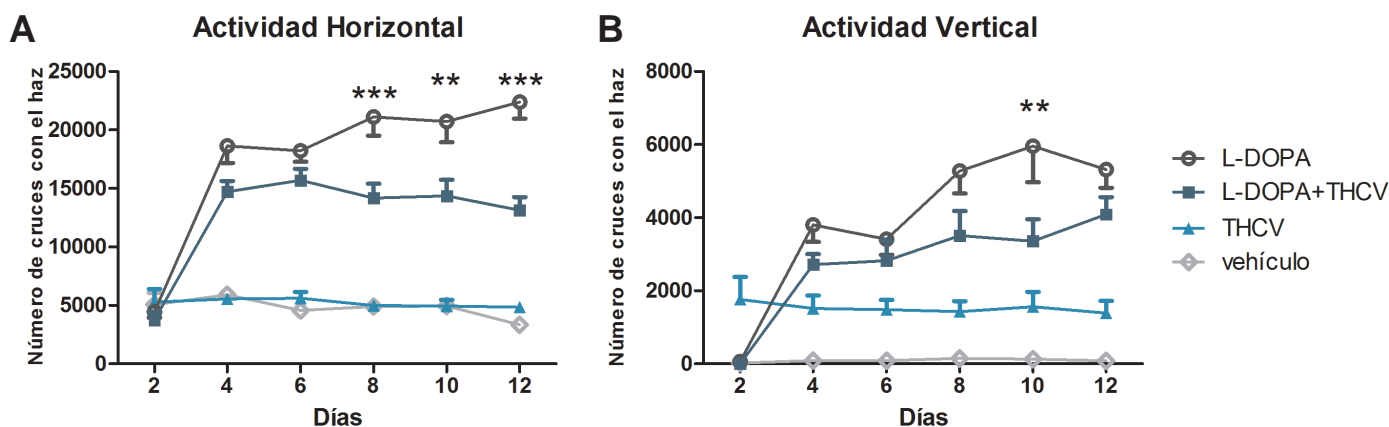


Figura 52. Actividad horizontal (A) y vertical (B) de los ratones *Pitx3^{-/-}* recogida en actímetro durante 30 min, comenzando 60 minutos después del tratamiento con vehículo, Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹), L-DOPA (10 mg·kg⁻¹) o la combinación de ambos. Los datos se representan como media ± SEM (n=10-19 animales por grupo), respecto de los 14 días de tratamiento, y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido del test de Bonferroni (**p<0.01, ***p<0.001 vs. L-DOPA).

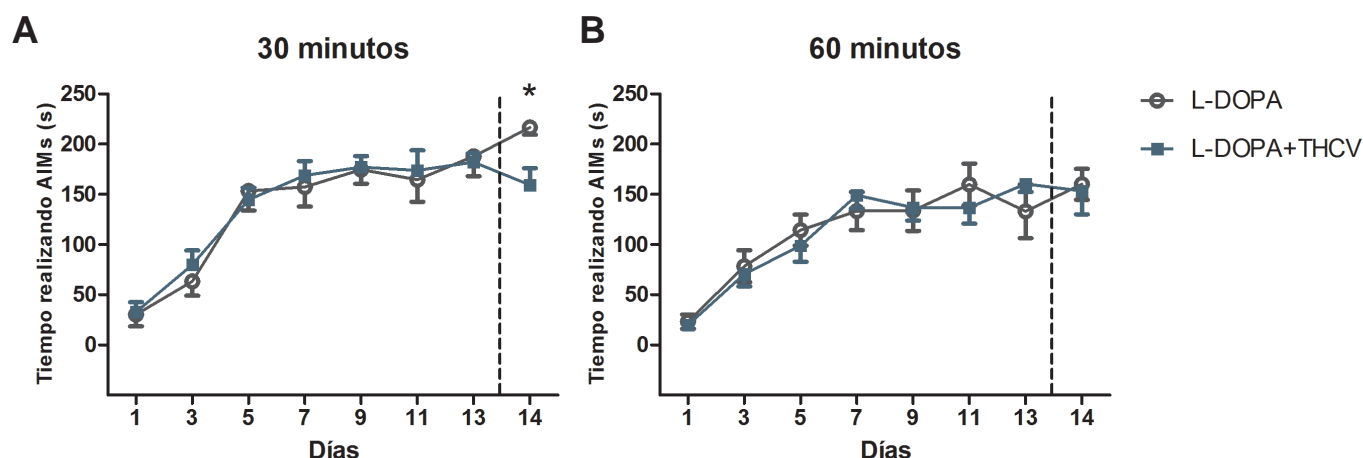


Figura 53. Efecto de Δ^9 -THCV sobre las disquinesias ya establecidas en ratones $Pitx3^{-/-}$ sometidos durante 13 días al tratamiento con L-DOPA ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), a los 30 (A) y 60 (B) minutos tras el tratamiento. El día 14, los animales recibieron una sola inyección de Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o vehículo 10 minutos después de la L-DOPA. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=10$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías (* $p < 0.05$).

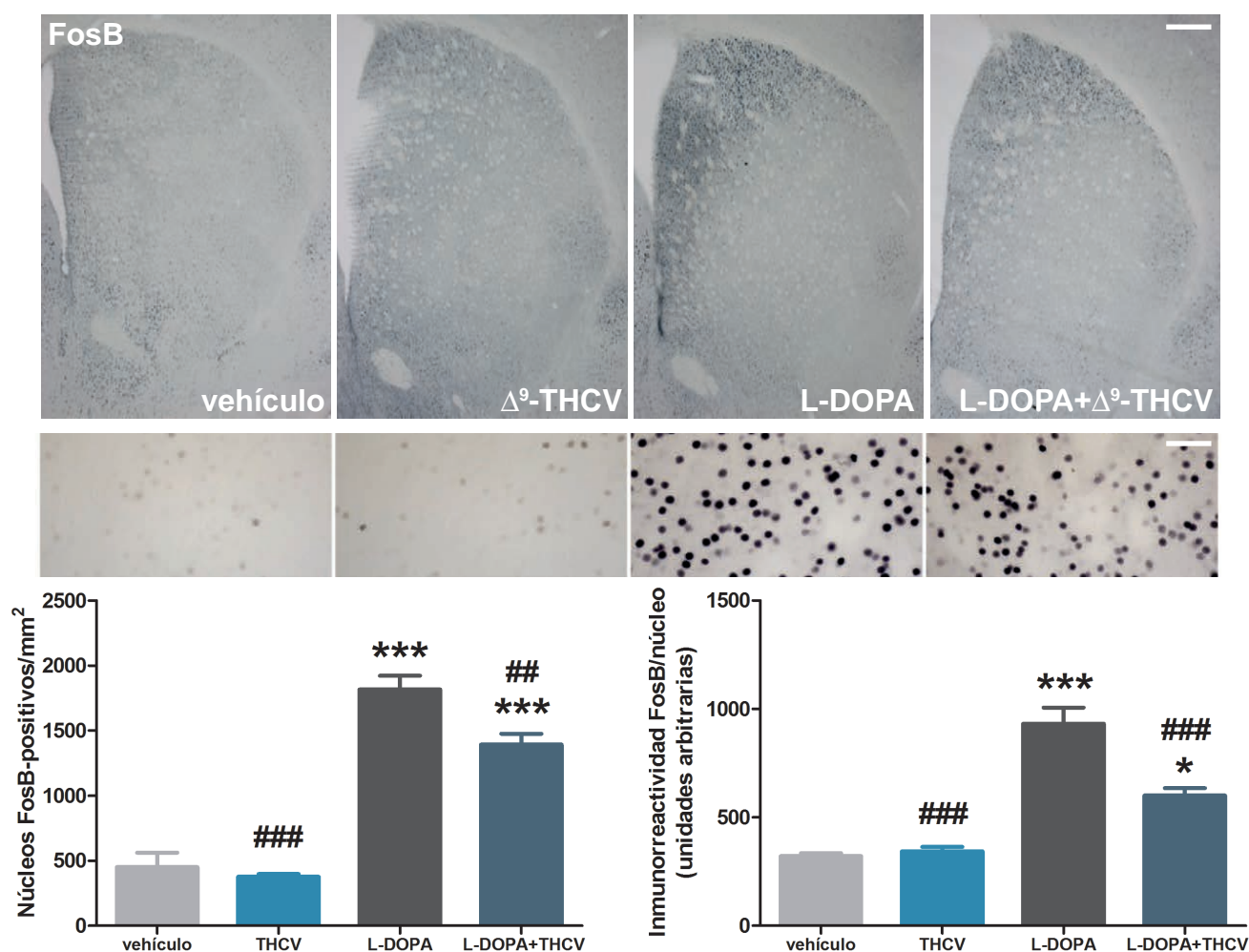


Figura 54. Cuantificación de la inmunotinción para FosB en el estriado de ratones $Pitx3^{-/-}$ tras el tratamiento con vehículo, Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), L-DOPA ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) o la combinación de ambos durante 14 días. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=10-19$ animales por grupo) del número de núcleos positivos/mm² o intensidad de inmunotinción/núcleo en unidades arbitrarias y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Student-Newman-Keuls (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. vehículo; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. L-DOPA). Con sus microfotografías representativas correspondientes (Barras de escala = 500 y 50 μm).

Otro marcador de la aparición de disquinesia asociada a L-DOPA es la fosfoacetilación de la histona 3 (pACh3). En estudios anteriores, Darmopil *et al.* (2009) mostraron que la administración repetida de L-DOPA a ratones lesionados unilateralmente con 6-OHDA provocaba un gran aumento de esta fosfoacetilación. Aquí, y por primera vez, nos

encontramos que los ratones *Pitx3*^{-/-} también presentaban este aumento de manera significativa después del tratamiento con L-DOPA (Figura 55A). El tratamiento de L-DOPA combinado con Δ^9 -THCV no provoca un descenso en el número de núcleos pACh3-positivos (Figura 55B), pero sí desciende significativamente la intensidad de inmunotinción de los mismos (Figura 55C).

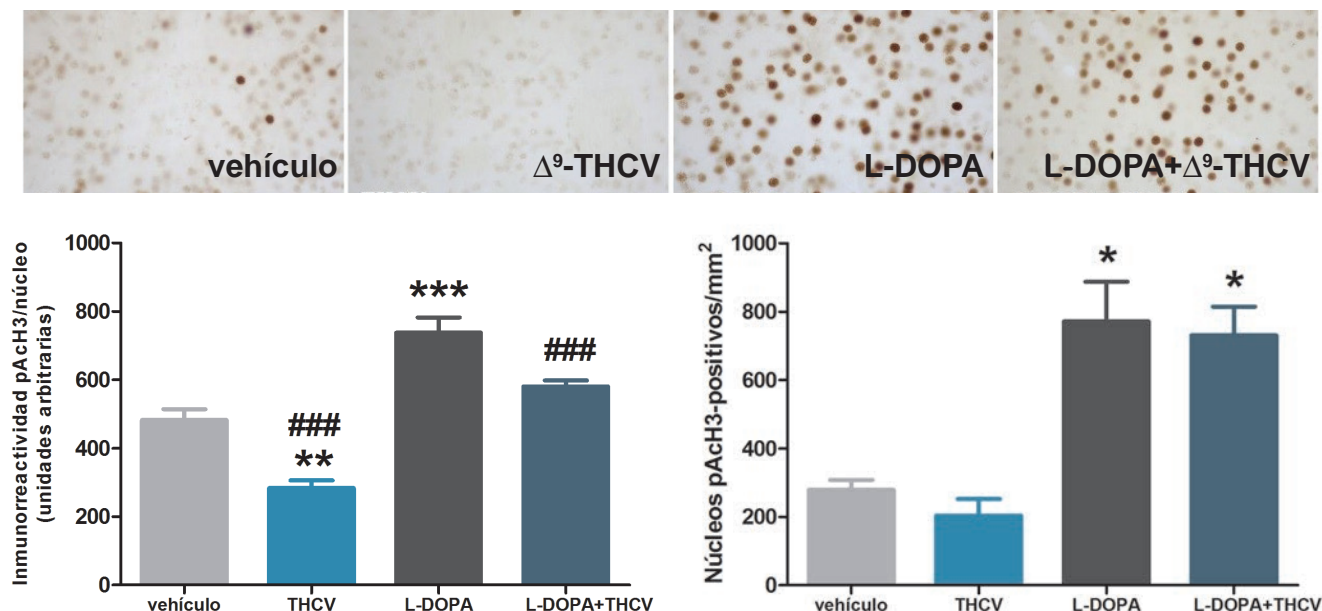


Figura 55. Cuantificación de la inmunotinción para pACh3 en el estriado de ratones *Pitx3*^{-/-} tras el tratamiento con vehículo, Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹), L-DOPA (10 mg·kg⁻¹) o la combinación de ambos durante 14 días. Los valores se expresan como media \pm SEM (n=10-19 animales por grupo) del número de núcleos positivos/mm² o intensidad de inmunotinción/núcleo en unidades arbitrarias y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Student-Newman-Keuls (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. vehículo; ###p<0.001 vs. L-DOPA). Con sus microfotografías representativas correspondientes (barra de escala = 50 μ m).

Diseño III: Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con agonistas CB₂ en el modelo *LRRK2-G2019S*

El último de los objetivos de esta Tesis Doctoral se planteó con el fin de investigar las alteraciones del Sistema Endocannabinoide y el potencial terapéutico de su manipulación farmacológica en la EP, que ya había sido estudiado ampliamente en modelos experimentales basados en neurotoxinas, pero que no había sido apenas estudiado en modelos genéticos de la enfermedad más allá de un par de estudios anteriores con algunos de los primeros modelos genéticos desarrollados para la EP, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (González *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2009).

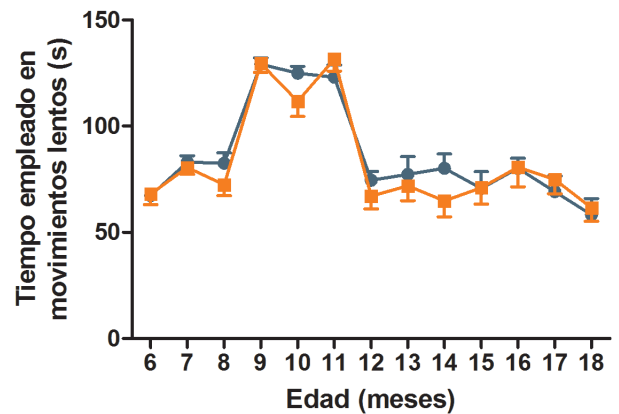
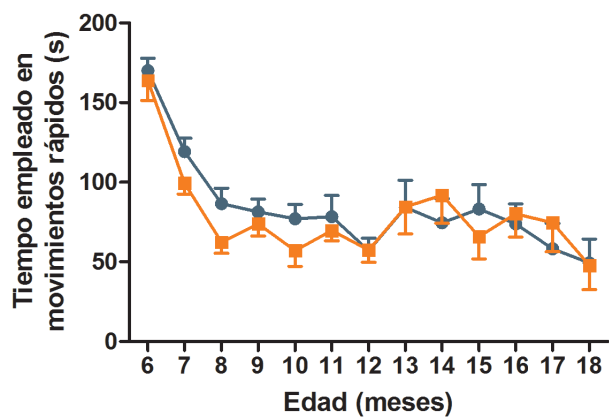
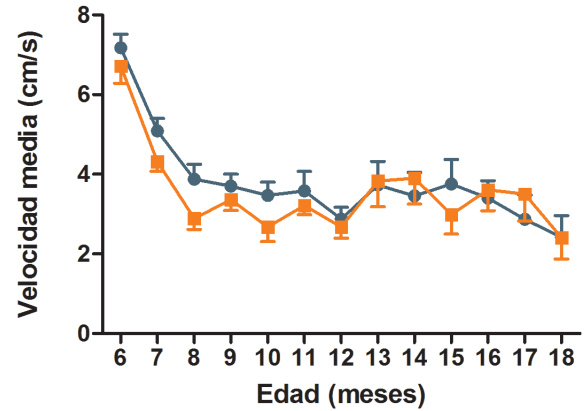
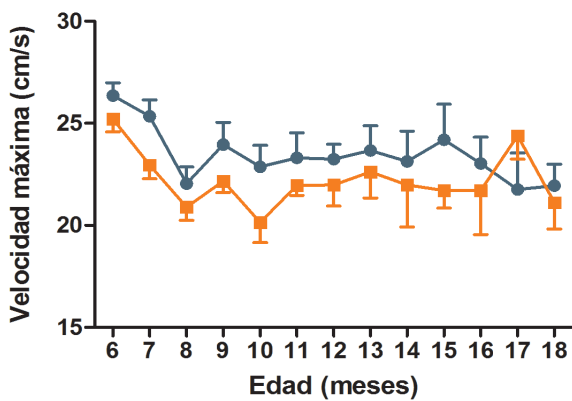
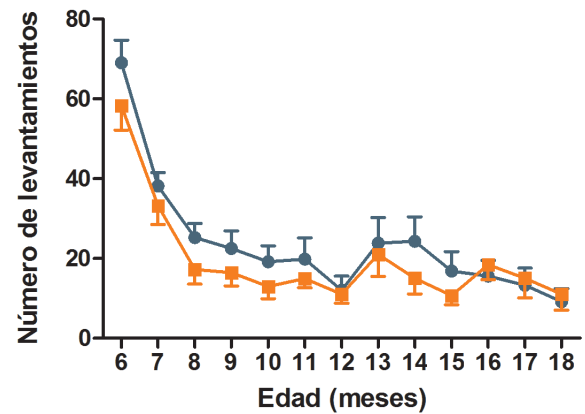
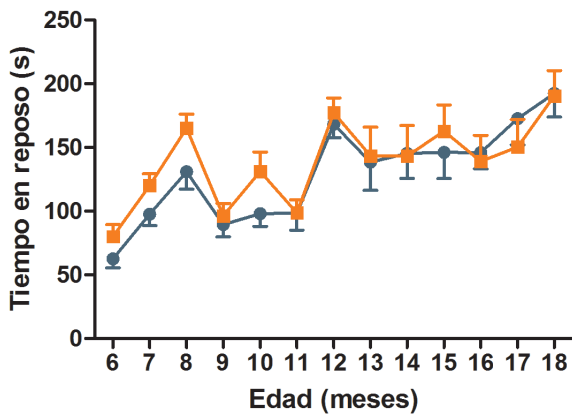
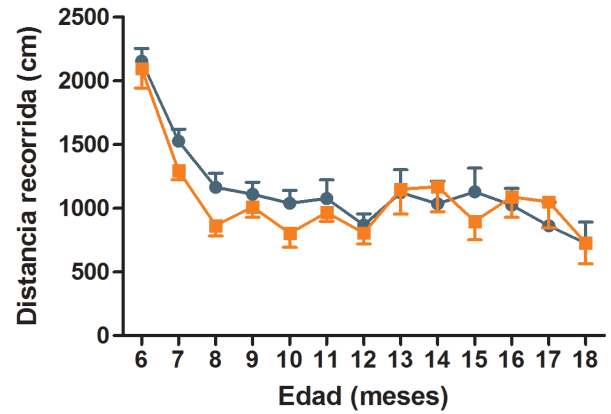
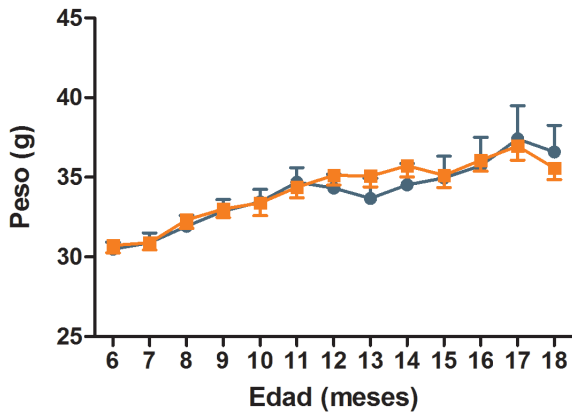
En este caso nos centramos en la mutación más prevalente en EP, correspondiente al *locus PARK8* que codifica la quinasa LRRK2, utilizando el modelo de ratones transgénicos desarrollado por el equipo del Dr. Darren Moore (Ramonet *et al.*, 2011). Como ya se ha explicado, este estudio se desarrolló en el marco de un proyecto financiado por la Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (USA).

Caracterización fenotípica y neuropatológica de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

El primer objetivo de este estudio fue la caracterización de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* desde el punto de vista neurológico y neuropatológico. Esperábamos encontrar los primeros síntomas característicos de parkinsonismo a la edad de 12 meses y que alcanzaran su máximo de gravedad a los 18 meses cuando el daño nigroestriatal debería hacerse patente según lo descrito anteriormente por Ramonet *et al.* (2011) y Chen *et al.* (2012). En el transcurso de los diferentes análisis y durante la manipulación, no se apreciaron diferencias significativas en cuanto al aspecto general de los animales. Tras registrar mensualmente el peso de los animales se pudo establecer que los ratones transgénicos no presentaban diferencias significativas en comparación con sus hermanos no-transgénicos (Figura 56). Se monitorizó también la evolución del comportamiento motor, desde los 6 meses de edad hasta el final del experimento (18 meses), y se pudo apreciar que los ratones transgénicos mostraban una mayor debilidad muscular en comparación con sus hermanos *wild-type*, patente en el *test* de la percha o *hanging-wire*, donde los ratones transgénicos permanecen mucho menos tiempo suspendidos de sus patas delanteras [Figura 56; variable genotipo: $F(1,268)=49.97$,

$p<0.0001$]. También observamos que los ratones transgénicos tenían menor coordinación al realizar peor la prueba del rotarod desde los 8 meses de edad, obteniendo el mínimo de permanencia en el aparato a los 16 meses [Figura 56; variable genotipo $F(1,293)=31.88$, $p<0.0001$]. Los ratones transgénicos realizaban en menor tiempo el *test* del mástil o *pole-test* [Figura 56; variable genotipo $F(1,293)=6.176$, $p<0.05$], un hecho que debería ser positivo, pero es posible que fuera debido aparentemente a su menor fuerza muscular que hace que se agarren peor a la superficie y la recorran antes, en lugar de deberse a una mejor condición fisiológica. Aunque las diferencias en la variable genotipo podían parecer ser significativas estudiando cada mes por separado, al someter los datos al análisis ANOVA de dos vías seguido del *test* de Bonferroni, estas diferencias no se pudieron confirmar en el tiempo.

Si nos centramos en las pruebas de síntomas más clásicos de parkinsonismo, por ejemplo, mediante el uso del actímetro, nuestro análisis tampoco demuestra que los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* desarrollen un fenotipo representativo de EP en cuanto a parámetros como la distancia recorrida, el tiempo realizando movimientos rápidos y lentos o el tiempo en inactividad, algo que ya describieron Ramonet *et al.* (2011), quienes realizaron estas pruebas hasta los 15 meses de edad. En nuestros análisis, en algunos casos, por ejemplo la actividad



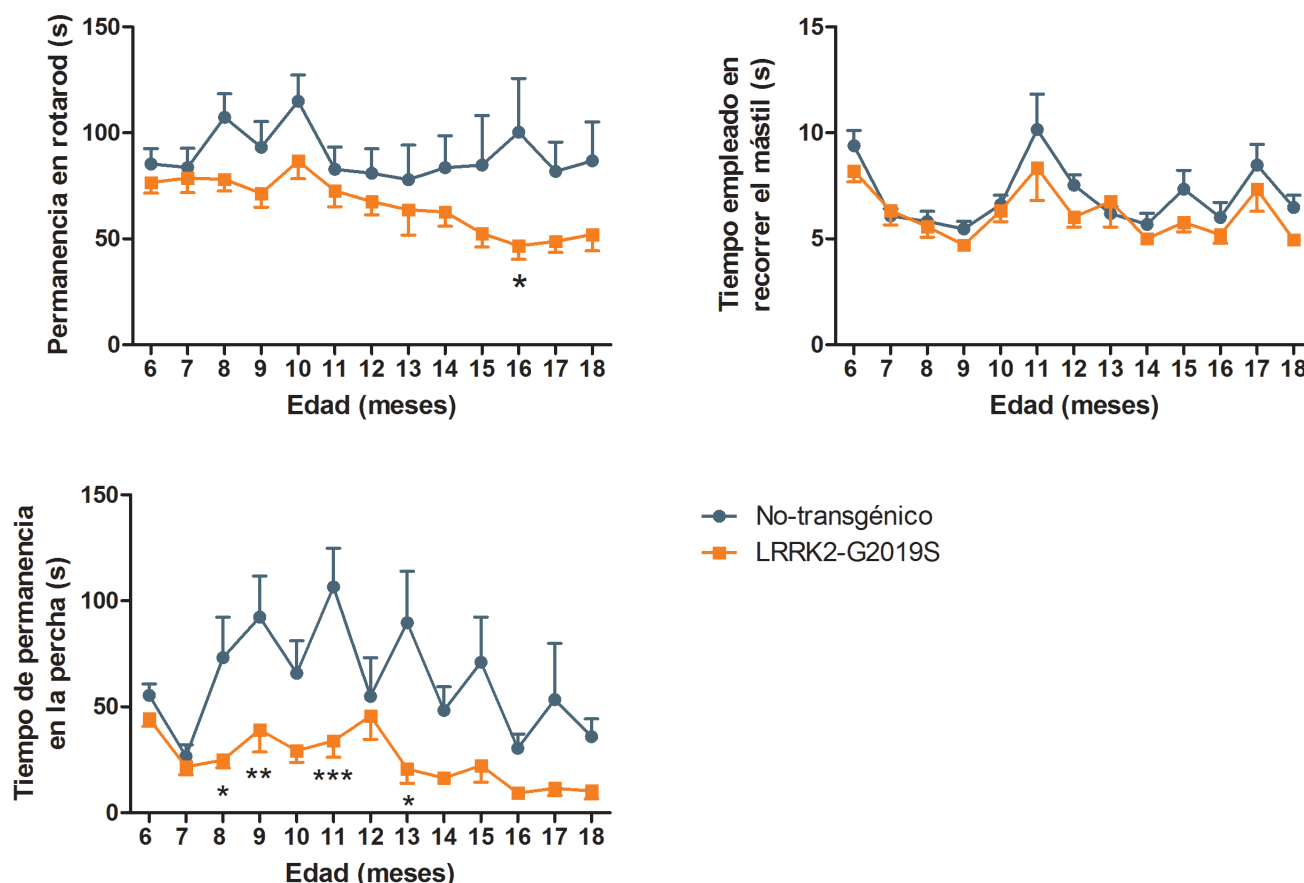


Figura 56: Análisis del peso y diferentes parámetros motores mediante los test de Rotarod, hanging-wire, test del mástil y actímetro en ratones transgénicos LRRK2-G2019S y wild-type a diferentes --edades. Los valores se representan como media \pm SEM ($n=7-8$ animales por grupo) y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido del test de Bonferroni (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ respecto a los ratones wild-type).

vertical (rearings) [Figura 56; $F(1,294)=4,242$, $p<0.05$] o velocidad máxima en ambulación [Figura 56; $F(1,294)=8.215$, $p<0.005$], sí que se alcanzaba un valor significativo mediante el test ANOVA de dos vías para la variable genotipo, pero las diferencias no eran visibles para cada edad mediante el test de Bonferroni.

Por tanto, a la vista de estos resultados se puede decir que los ratones transgénicos LRRK2-G2019S presentaban algunos indicios de síntomas compatibles con un fenotipo de déficit motor, aunque muy leve y que no evidenciaba empeoramiento a lo largo del tiempo, al menos hasta los 18 meses de edad. Para determinar si estos pequeños cambios tenían reflejo en la integridad de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales, se realizó un análisis inmunohistoquímico de los cerebros recogidos a los 6, 12 y 18 meses, con los que pudimos confirmar que no había una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* de los ratones transgénicos en comparación con los *wild-type* en ninguno de los tres puntos de edad estudiados (Figura

57). Esto contrastaba, en cierta medida, con los resultados obtenidos por Ramonet *et al.* (2011), quienes encontraron pérdida de neuronas dopaminérgicas en estos ratones a los 19-20 meses, aunque en un nivel muy modesto (17-18%) como para ocasionar déficit motor, un hecho que los propios autores también pudieron observar y asumir.

Encontramos la misma situación en la inmunotinción para IBA1 tanto en sustancia *nigra* como en estriado, descartando así la existencia de microgliosis reactiva en las tres edades estudiadas (Figuras 58 y 59), resultado que también concuerda con los obtenidos por Ramonet *et al.* (2011), quienes encontraron iguales niveles, en este caso, de astrogliosis entre los ratones transgénicos y los *wild-type* utilizando la técnica de inmunotinción con GFAP.

Estos resultados inmunohistoquímicos reflejan la ausencia del daño nigroestriatal esperado entre los 12 y 18 meses de edad, lo que puede traducirse en que este modelo, más que de daño neuronal, puede tratarse de un modelo de malfuncionamiento a nivel sináptico.

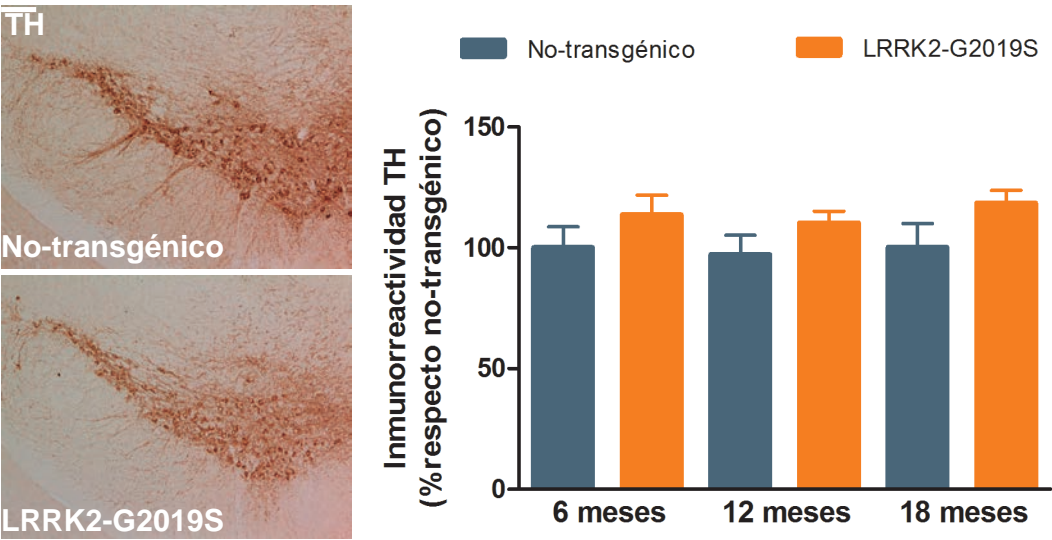


Figura 57 Análisis de la inmunotinción para TH en la sustancia nigra de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y wild-type a los 6, 12 y 18 meses de edad. Los valores corresponden a porcentaje sobre los animales wild-type y se representan como las medias \pm SEM ($n= 6-8$ animales por grupo) y están sujetos al test de la t de Student ($p<0.05$) Junto con las microfotografías representativas correspondientes a los 18 meses de edad (barra de escala = 100 μ m).

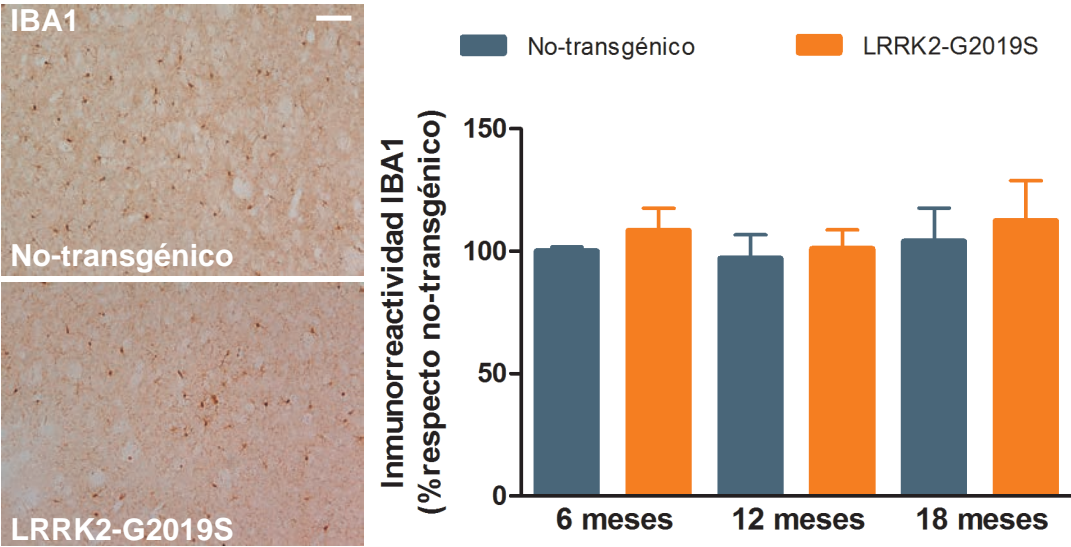


Figura 58 Análisis de la inmunotinción para IBA1 en estriado de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y wild-type a los 6, 12 y 18 meses de edad. Los valores corresponden a porcentaje sobre los animales wild-type y se representan como las medias \pm SEM ($n= 6-8$ animales por grupo) y están sujetos al test de la t de Student ($p<0.05$.) Junto con las microfotografías representativas correspondientes a los 18 meses de edad (barra de escala = 50 μ m).

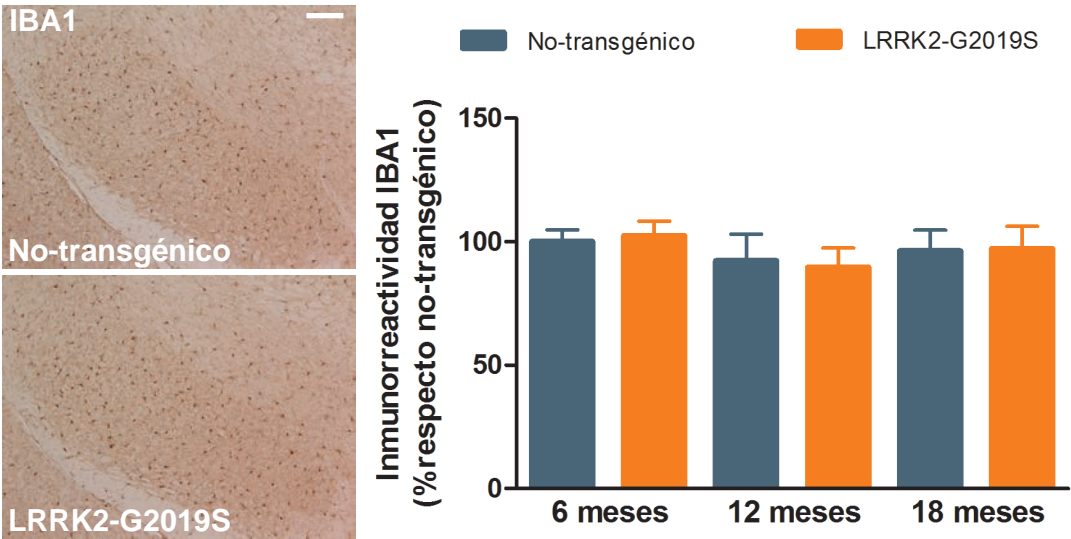


Figura 59 Análisis de la inmunotinción para IBA1 en la sustancia nigra de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y no-type a los 6, 12 y 18 meses de edad. Los valores corresponden a porcentaje sobre los animales no-transgénicos y se representan como las medias \pm SEM ($n= 6-8$ animales por grupo) y están sujetos al test de la t de Student ($p<0.05$). Junto con las microfotografías representativas correspondientes a los 18 meses de edad (barra de escala = 100 μ m)

Evaluación de marcadores de parkinsonismo en los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

Debido a que nuestros procedimientos inmunohistoquímicos no reflejaban la existencia de daño nigroestriatal a pesar de los resultados descritos por otros autores previamente (Ramonet *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2012), pensamos que posiblemente el modelo de ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* refleje más una situación de parkinsonismo temprano, como también propusieron Chou *et al.* (2014), cuyos ratones, también basados en la mutación G2019S en *LRRK2*, presentaban déficit motor no asociado a degeneración nigroestriatal.

Decidimos entonces buscar posibles cambios de expresión en marcadores de parkinsonismo temprano como la ALDH1A1 (Grunblatt *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2015) o de factores con valor instrumental en la EP como COX-2 o TNF- α (Teismann *et al.*, 2003, De Lella Ezcurra *et al.*, 2010). Aun así, no encontramos diferencias en

ninguno de los marcadores en la sustancia *nigra* de los animales transgénicos respecto de los *wild-type* a la edad de 18 meses (Figura 60).

Buscando otros signos que reflejen alteraciones en los ganglios basales compatibles con parkinsonismo, analizamos el marcador de autofagia LAMP-1 en los ganglios basales de los ratones de 18 meses de edad. Los procesos de autofagia están involucrados en la eliminación de agregados proteicos y mitocondrias dañadas en estadios avanzados e intermedios de la enfermedad, así como en la regulación de la estructura y función sináptica en fases tempranas (Plowey y Chu, 2011), como parece ocurrir también en los casos en que la mutación del gen *LRRK2* está presente (Hockey *et al.*, 2015). Ramonet *et al.* (2011) habían encontrado anomalías en este aspecto en los ratones transgénicos a la edad de 17-18 meses, y en nuestro caso encontramos un aumento en el marcaje de LAMP-1 tanto en el estriado como en la sustancia *nigra* (Figura 61).

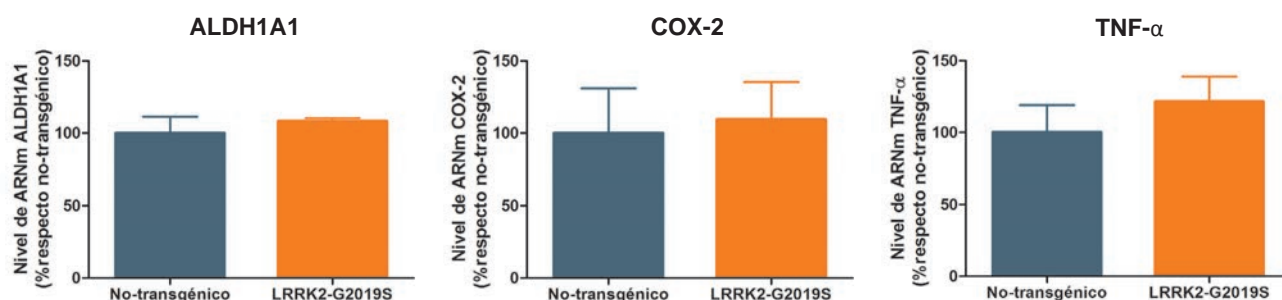


Figura 60: Niveles de expresión de ARNm de ALDH1A1, COX-2 y TNF- α cuantificados por qRT-PCR en la sustancia nigra de ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* y no-transgénicos de 18 meses de edad. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=6-8$ animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto de los ratones no-transgénicos y están sujetos al test de la *t* de Student ($*p<0.05$).

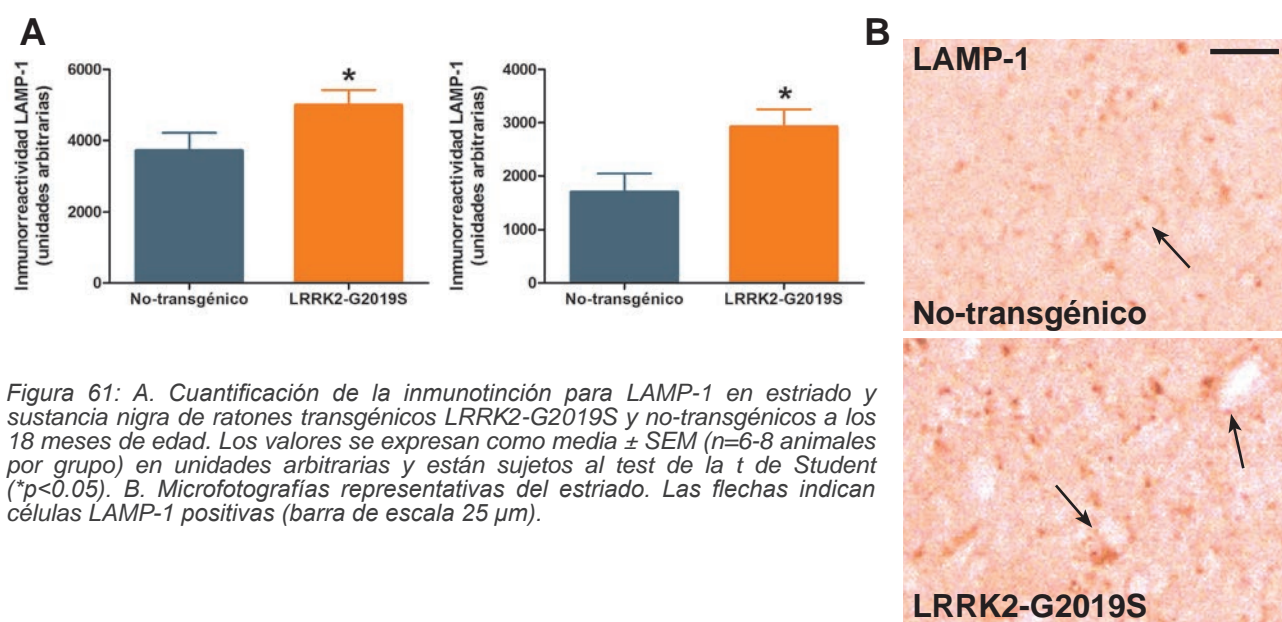


Figura 61: A. Cuantificación de la inmunotinción para LAMP-1 en estriado y sustancia nigra de ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* y no-transgénicos a los 18 meses de edad. Los valores se expresan como media \pm SEM ($n=6-8$ animales por grupo) en unidades arbitrarias y están sujetos al test de la *t* de Student ($*p<0.05$). B. Microfotografías representativas del estriado. Las flechas indican células LAMP-1 positivas (barra de escala 25 μ m).

Por último, debido a que las alteraciones motoras de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* no se vieron en el actímetro, sino en los *tests* del rotarod y de la percha, que reflejan más coordinación motora y/o fuerza muscular, pensamos que otras estructuras del SNC distintas de los ganglios basales podrían ser las afectadas y que estas fueran las responsables de este déficit motor. Pensamos en el cerebelo por los déficits en coordinación motora, y en la médula espinal por los déficits en fuerza muscular, pero sólo disponíamos de muestras de cerebelo sobre las que investigar un marcador de células de Purkinje como la calbindina. Desafortunadamente no encontramos ninguna evidencia de degeneración en el cerebelo de los ratones transgénicos de 18 meses de edad al realizar una inmunotinción para este marcador (Figura 62)

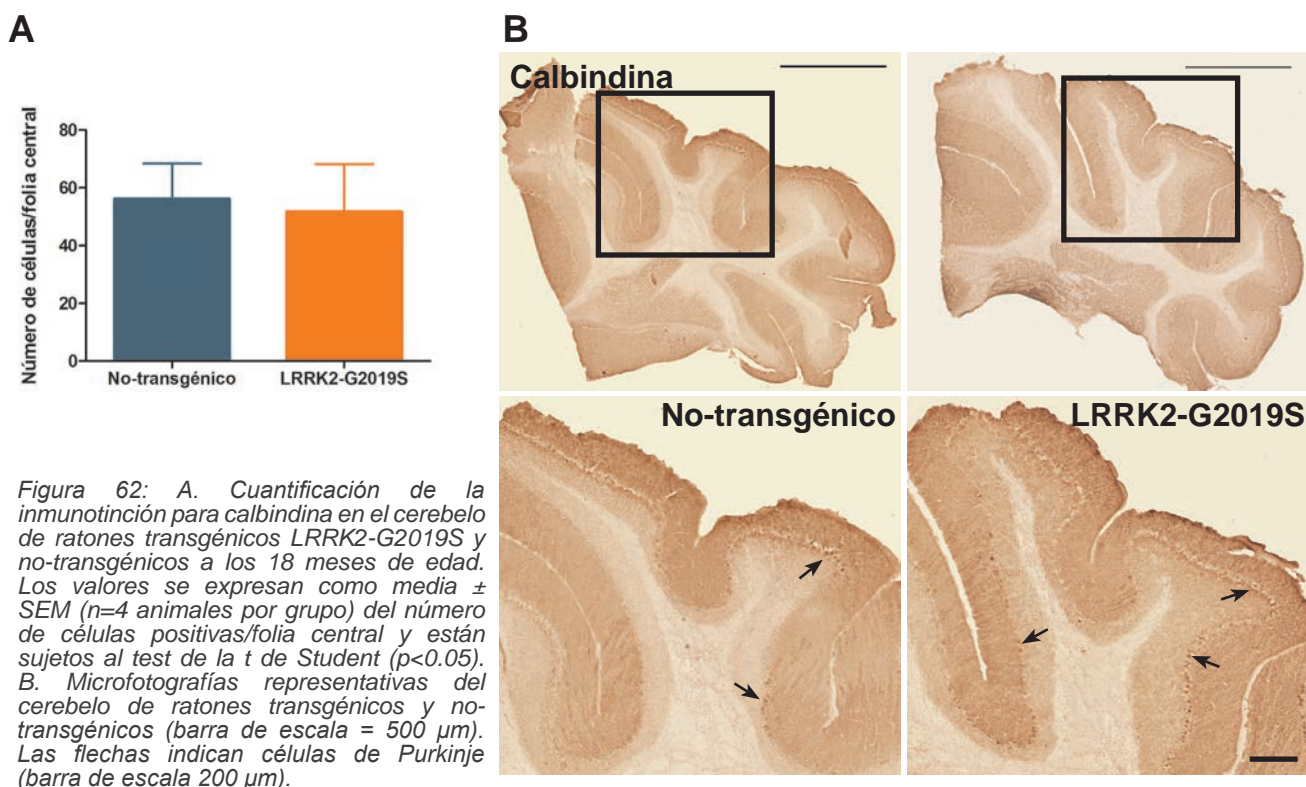
Evaluación del Sistema Endocannabinoide en los ganglios basales de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

Pese a la falta de neurodegeneración evidente en los ratones transgénicos, nos propusimos evaluar el estatus de elementos clave del Sistema Endocannabinoide. Para ello, cuantificamos los niveles de expresión por qRT-PCR del receptor CB₂ y las enzimas de degradación de cannabinoides FAAH y MAGL en sustancia *nigra*, globo pálido y estriado, a las

edades de 6, 12 y 18 meses. No encontramos diferencias entre animales transgénicos y *wild-type* en ninguna de las tres estructuras ni edades analizadas (Figura 63), a excepción de un leve incremento de la expresión de MAGL en la sustancia *nigra* de los ratones transgénicos de 6 meses de edad pero que no se mantuvo en las siguientes edades analizadas.

El receptor CB₂ como diana del tratamiento de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*

El último objetivo de este estudio consistió en diseñar una estrategia farmacológica con cannabinoides capaz de atenuar las anomalías encontradas en los ratones *LRRK2-G2019S*, como la debilidad muscular demostrada en el *test* de la percha y la distonía o descoordinación motora detectada en el *test* del rotarod, o el aumento del marcador de fagocitosis LAMP-1. Nos centramos en la activación del receptor CB₂ mediante el uso del agonista selectivo HU-308 y del fitocannabinoide Δ^9 -THCV, sin olvidarnos de que éste último compuesto además de agonista CB₂, es antagonista CB₁ y antioxidante, por lo que podría aportar otras ventajas adicionales. Se trataron los animales con Δ^9 -THCV (GW Pharmaceuticals; 2 mg·kg⁻¹, i.p.) o HU-308 (Tocris; 5 mg·kg⁻¹, i.p.) diariamente durante 6 meses, desde los 12 hasta los 18 meses de edad. Para confirmar que los posibles efectos estuvieran mediados por la activación del



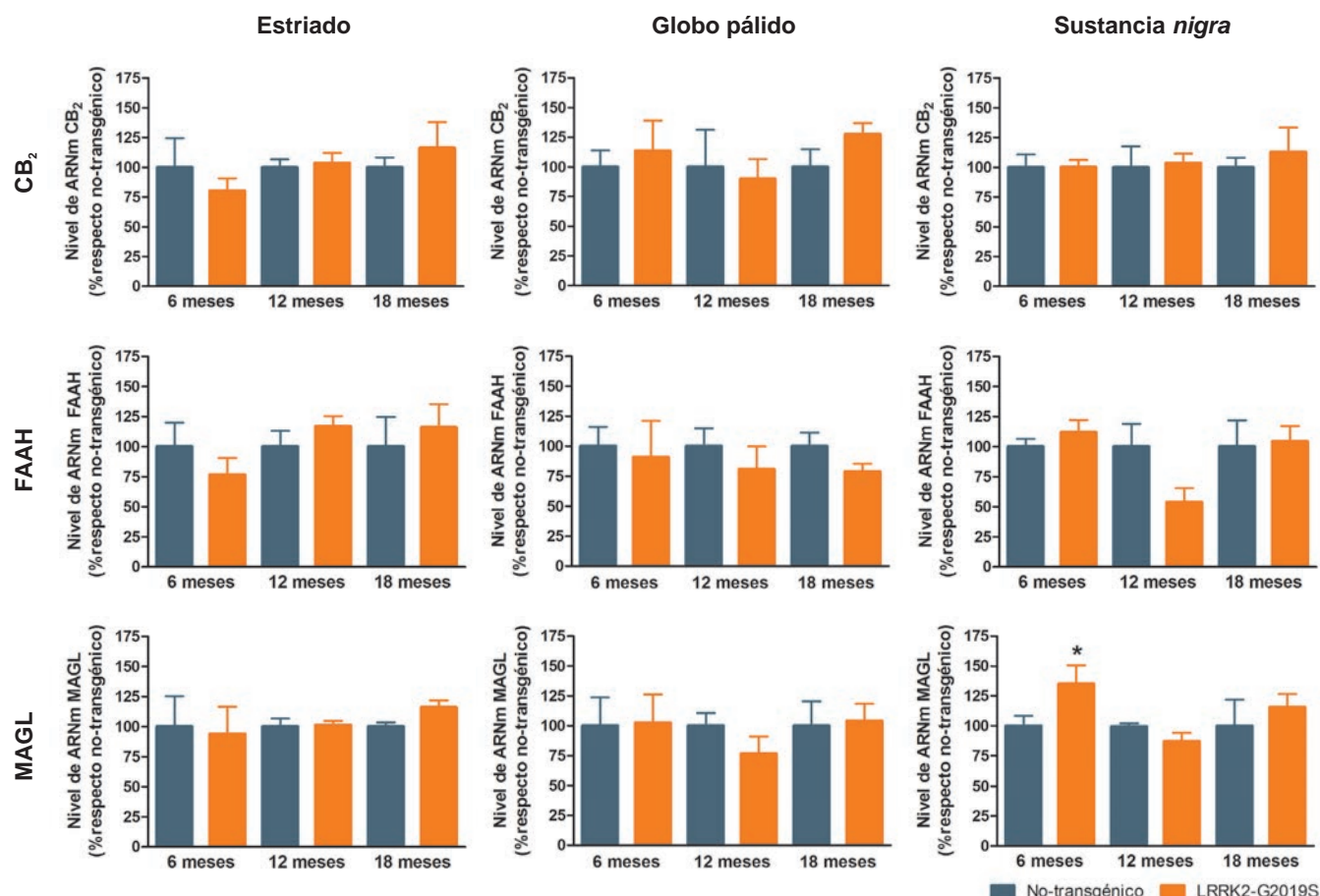


Figura 63. Niveles de expresión de ARNm del receptor CB₂ y las enzimas FAAH y MAGL cuantificadas por qRT-PCR en estriado, globo pálido y sustancia nigra de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y no-transgénicos a los 6, 12 y 18 meses de edad. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=6-8$ animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto de los ratones no-transgénicos para cada edad y zona cerebral y están sometidos al test de la *t* de Student (* $p<0.05$).

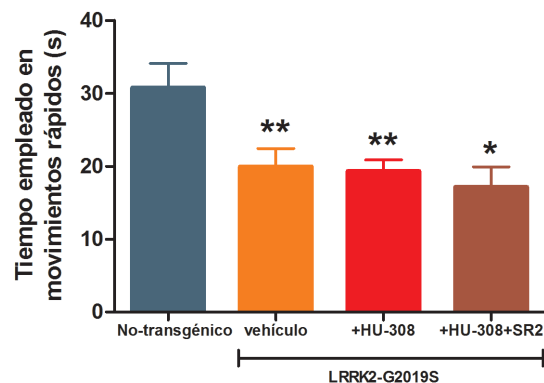
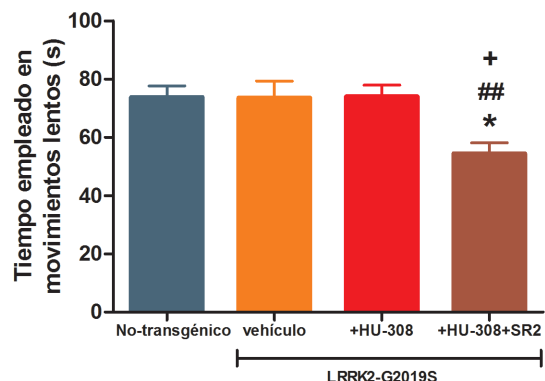
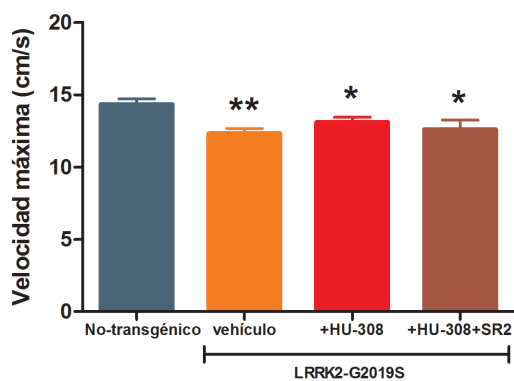
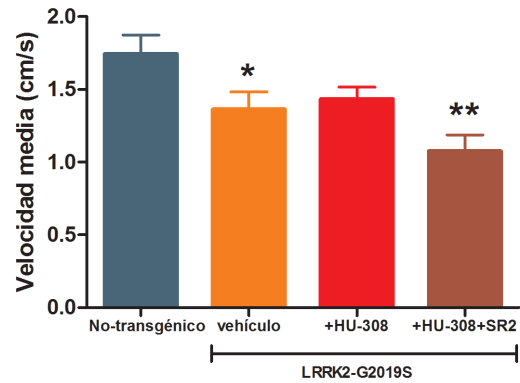
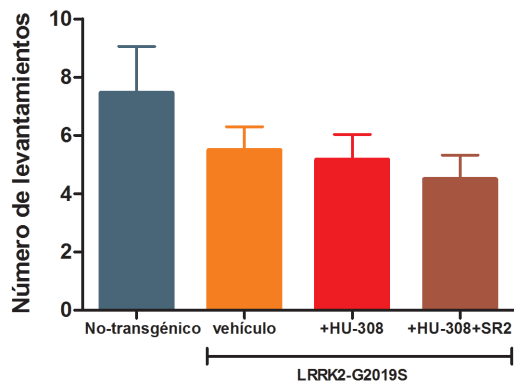
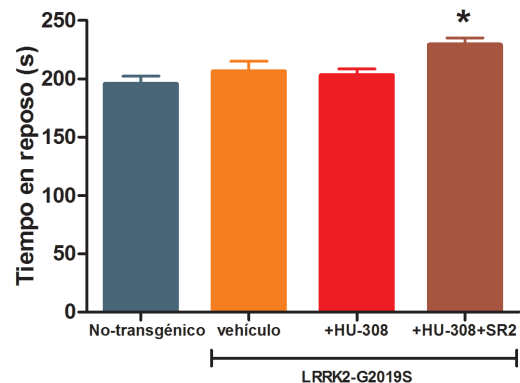
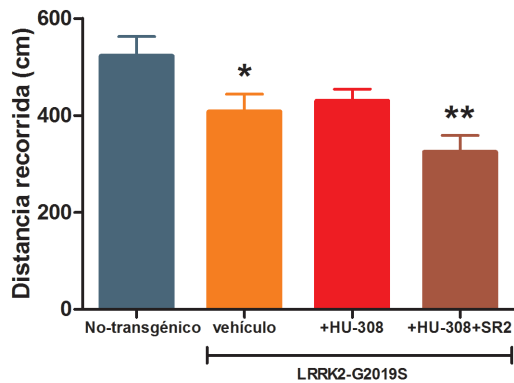
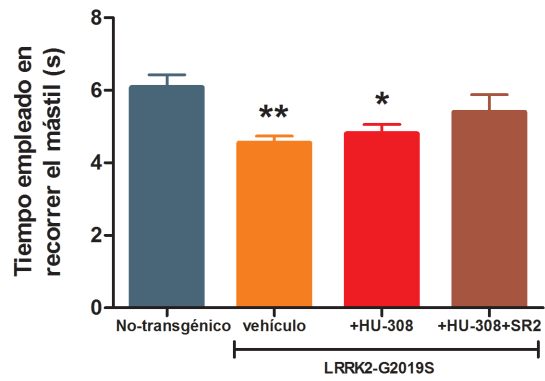
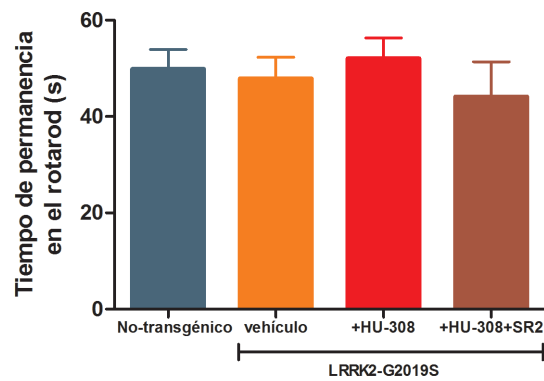
receptor CB₂, se incluyeron dos grupos que recibieron el compuesto Δ^9 -THCV o HU-308 en combinación con el antagonista CB₂ SR 144528 (Cayman Chemical; 1 mg·kg⁻¹, i.p.).

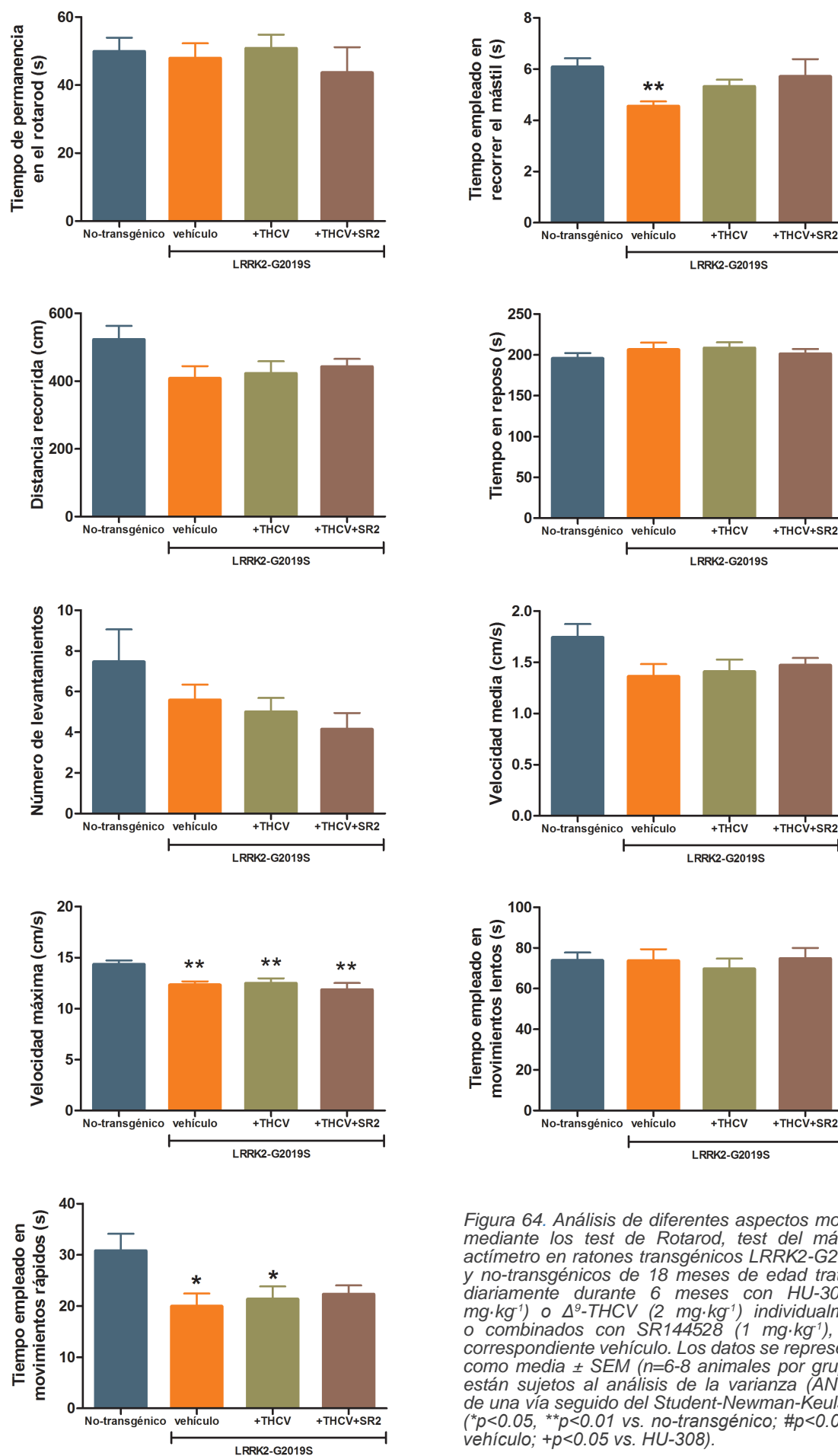
En esta ocasión, los ratones transgénicos no desarrollaron un comportamiento alterado en el *test* del rotarod (Figura 64) en comparación con el primer experimento (Figura 56). Lo mismo ocurre en el caso del pole *test* (Figura 64), aunque aquí sí que aparecía una tendencia similar al comportamiento encontrado en el experimento anterior (Figura 56). Cuando se trata del comportamiento motor medido en el actímetro, se reproducen las observaciones obtenidas del primer experimento, sin cambios en la mayoría de los parámetros, excepto una cierta tendencia de los ratones transgénicos hacia una menor distancia recorrida, velocidades media y máxima y movimientos rápidos (Figura 64), alcanzando esta diferencia significación estadística en comparación con sus hermanos no-transgénicos en varios parámetros como la distancia recorrida [Figura 64; $F(3,53)=3.99$, $p<0.05$] y la velocidad media [Figura 64; $F(3,53)=4.003$, $p<0.05$], además de una tendencia a disminuir los movimientos lentos [Figura 64; $F(3,54)=2.762$,

$p<0.05$], lo que podría significar que un bloqueo del receptor CB₂ agrava el fenotipo motor de los ratones LRRK2-G2019S en el actímetro.

En el caso del *test* de la percha, los ratones LRRK2-G2019S sí repiten el comportamiento observado en el primer experimento, y es aquí donde encontramos el efecto más acusado en el tratamiento con los agonistas CB₂, ya que pudimos apreciar que los ratones transgénicos tratados tanto con Δ^9 -THCV como HU-308 permanecen más tiempo colgados de la percha que sus hermanos sin tratar, y además, este efecto desaparece completamente cuando los cannabinoides se administran junto al antagonista, como se puede ver en la Figura 65, donde se representa el resultado del *test* de la percha a tiempo final, después de 6 meses de tratamiento, cuando los efectos de los cannabinoides son más acusados. No obstante, éstos beneficios eran ya evidentes desde los 2 meses después de iniciar el tratamiento en esta prueba comportamental (datos no mostrados).

El siguiente objetivo fue determinar si las mejoras observadas a nivel comportamental eran causadas por efectos neuroprotectores





de estos dos cannabinoides en los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S*, pero de nuevo, no pudimos detectar daño nigroestriatal (Figura 66) en este modelo animal con las técnicas utilizadas. Tampoco encontramos un aumento de la activación microglial (Figura 66), por lo que no podemos afirmar que la activación del receptor CB_2 tenga un efecto positivo a este respecto. Es posible que los sustratos neuronales que subyacen a estos efectos no estén localizados en los ganglios basales, puede que estén implicadas las motoneuronas espinales o las

uniones neuromusculares, pero no dispusimos de material biológico para poder investigar esta cuestión.

También nos planteamos si las mejoras en cuanto a comportamiento podían deberse a cambios en varios marcadores de parkinsonismo temprano o de riesgo, por lo que decidimos medir los niveles de ALDH1A1, COX-2 y TNF- α mediante qRT-PCR, pero tampoco obtuvimos diferencias entre los distintos tratamientos (Figura 67).

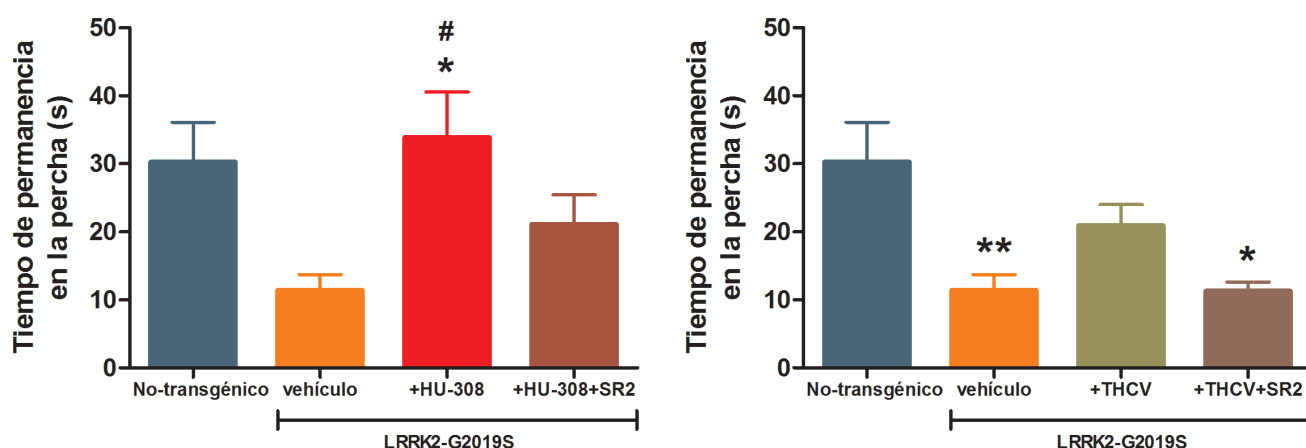


Figura 65 Tiempo empleado en la realización del test de la percha por ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* y no transgénicos de 18 meses de edad tratados diariamente durante 6 meses con HU-308 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) solos o combinados con SR144528 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), o el correspondiente vehículo. Los datos se representan como media \pm SEM ($n=6-8$ animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto a los no-transgénicos y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del Student-Newman-Keuls test (* $p<0.05$). $F(3,51)=3.728$, $p<0.05$)

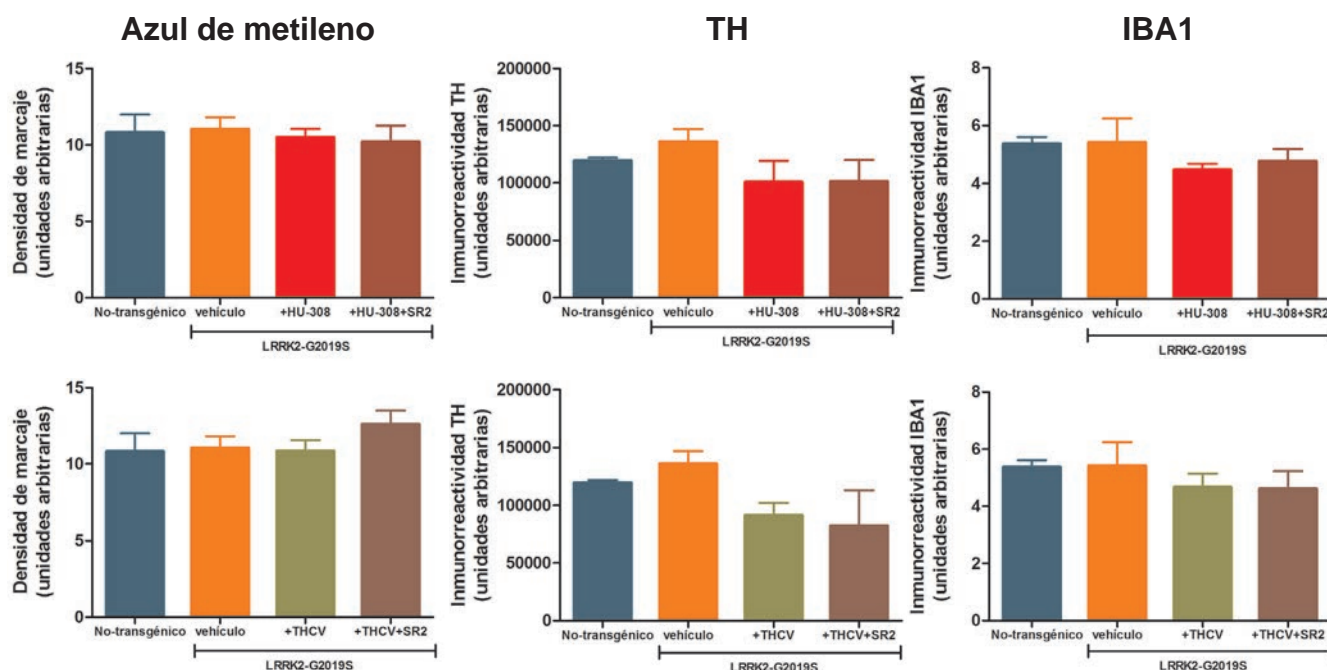


Figura 66. Cuantificación de la tinción de azul de metileno e inmunotinciones para TH e IBA1 de la sustancia nigra de ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* y no transgénicos de 18 meses de edad tratados diariamente durante 6 meses con HU-308 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) solos o combinados con SR144528 ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), o el correspondiente vehículo. Los datos se representan como media \pm SEM en unidades arbitrarias ($n=6-8$ animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto a los no-transgénicos y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$).

Sí encontramos que la elevación del marcador de fagocitosis LAMP-1 detectada en los ratones transgénicos se vio reducida en el estriado hasta los niveles de los ratones no-transgénicos tras el tratamiento con HU-308, y que este hecho era atenuado significativamente por el co-tratamiento con el antagonista del receptor

CB₂ [Figura 68; $F(3,20)=3.608$, $p<0.05$], no encontramos esta reducción en el caso de la sustancia *nigra* (Figura 68). Todo esto apoyaría la idea de que una activación del receptor CB₂ podría corregir un potencial malfuncionamiento neuronal reflejado en una respuesta autofágica anómala.

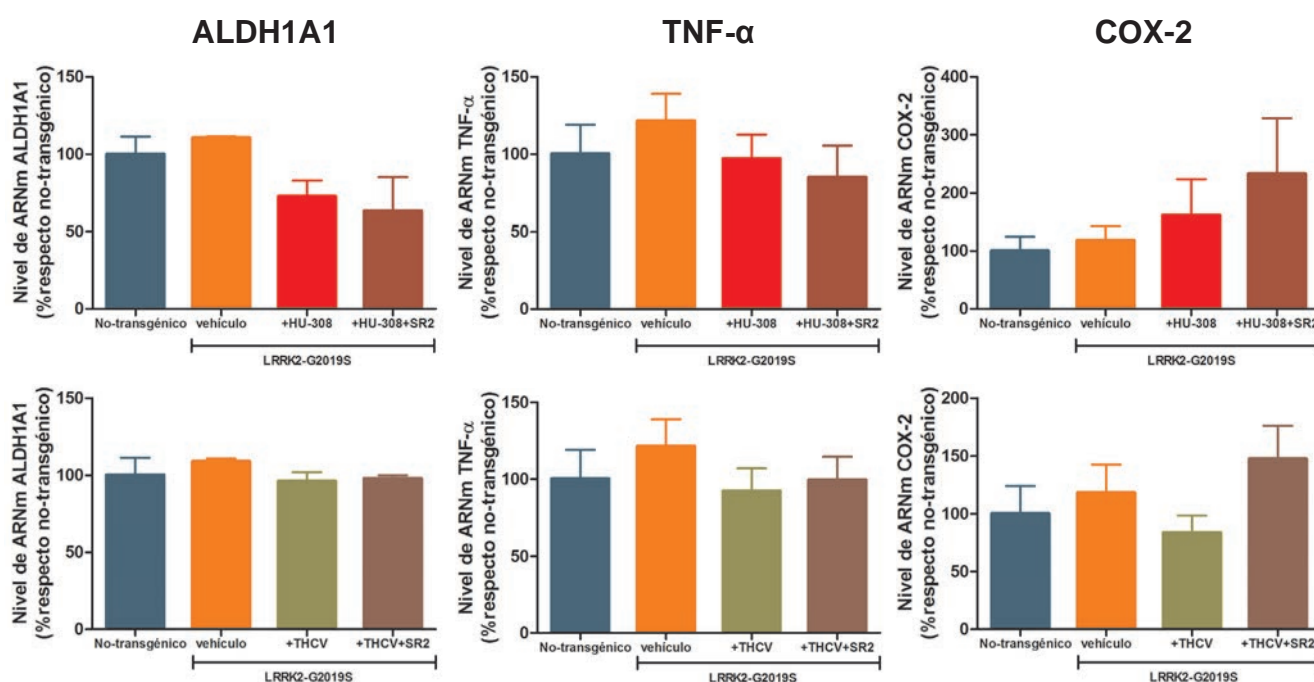


Figura 67. Niveles de expresión de ARNm de ALDH1A1, COX-2 y TNF-α cuantificadas por qRT-PCR en la sustancia nigra de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y no-transgénicos de 18 meses de edad tratados diariamente durante 6 meses con HU-308 (5 mg·kg⁻¹), Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹) solos o combinados con SR144528 (1 mg·kg⁻¹), o el correspondiente vehículo. Los datos se representan como media ± SEM (n=6-8 animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto a los no-transgénicos y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del Student-Newman-Keuls test ($p<0.05$).

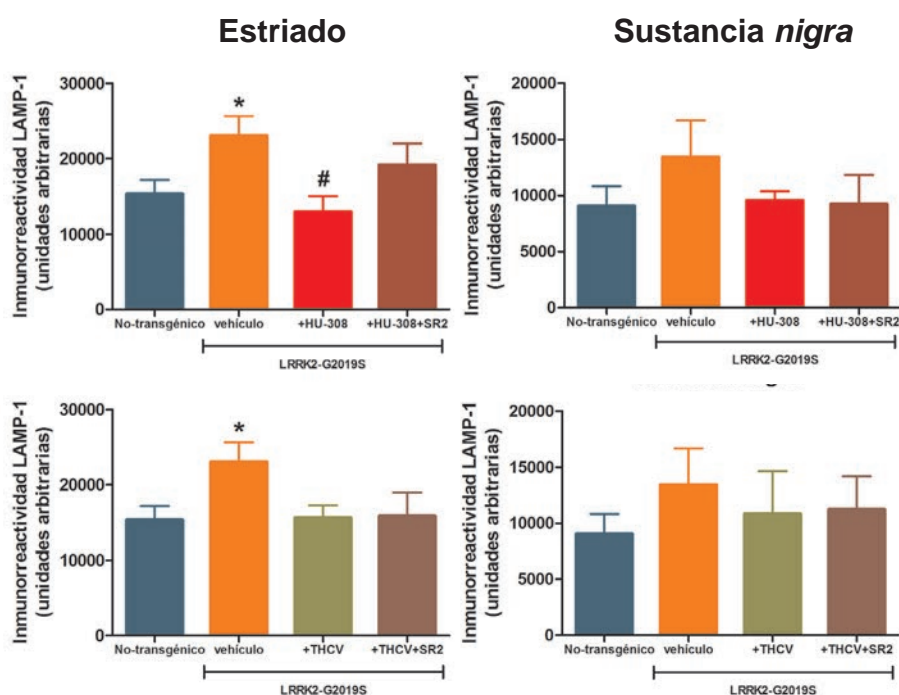


Figura 68. Cuantificación de la inmunotinción para LAMP-1 en sustancia nigra y estriado de ratones transgénicos LRRK2-G2019S y no-transgénicos de 18 meses de edad tratados diariamente durante 6 meses con HU-308 (5 mg·kg⁻¹), Δ⁹-THCV (2 mg·kg⁻¹) solos o combinados con SR144528 (1 mg·kg⁻¹), o el correspondiente vehículo. Los datos se representan como media ± SEM en unidades arbitrarias (n=6-8 animales por grupo) correspondiente al porcentaje respecto a los no-transgénicos y están sujetos al análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test Student-Newman-Keuls (* $p<0.05$ vehículo vs. no-transgénicos; # $p<0.05$ HU-308 vs. vehículo).



DISCUSIÓN



Los resultados de la presente Tesis Doctoral se engloban dentro del campo de la investigación experimental sobre la Enfermedad de Parkinson, la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia después de la Enfermedad de Alzheimer, y la primera en cuanto a alteración primaria de los ganglios basales. Nuestro trabajo se enfoca hacia el desarrollo de fármacos con acción sobre el Sistema Endocannabinoide por dos razones, primero por el potencial terapéutico mostrado por ciertos cannabinoides, y segundo porque este sistema se encuentra alterado durante el transcurso de la enfermedad.

Análisis de los cambios en el receptor CB₂ en la Enfermedad de Parkinson

El receptor CB₂ se encuentra sobreexpresado en diversas enfermedades neurodegenerativas y está ampliamente aceptado que este receptor juega un papel importante en la defensa frente a los eventos inflamatorios que ocurren en estas patologías (Ashton y Glass, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010). *A priori*, este hecho incluiría también a la EP, pero hasta el momento existían pocos estudios que demostraran esta elevación, únicamente en animales lesionados con MPTP (Price *et al.*, 2009), hasta el inicio de esta Tesis Doctoral, y de forma más reciente con rotenona (Concannon *et al.*, 2016). No había datos al respecto de este hecho en humanos, de manera que nuestros resultados indican, por primera vez, que existe también esta sobreexpresión del receptor CB₂ en la sustancia *nigra* de pacientes afectados por EP, estando este receptor presente en la microglía activada. Los estudios de doble marcaje confirman así la relación directa entre la elevación de los niveles del receptor CB₂ y el aumento de microgliosis reactiva, que es la que posiblemente prolifera, es reclutada y migra hacia las zonas de lesión, y macrófagos infiltrados, como también se ha demostrado en Alzheimer (Benito *et al.*, 2003), esclerosis lateral amiotrófica (Yiangou *et al.*, 2006) y esclerosis múltiple (Benito *et al.*, 2007; Yiangou *et al.*, 2006), Huntington (Sagredo *et al.*, 2009), dolor neuropático (Guindon y Hohmann, 2008), isquemia (Schmidt *et al.*, 2012) y ataxias espinocerebelosas (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014). Sin embargo, esta es la primera vez que se comprueba en pacientes de EP, a pesar de que la neuroinflamación glial está fuertemente ligada a la degeneración progresiva de las neuronas nigrales (Ouchi *et al.*, 2005).

Conseguimos reproducir la sobreexpresión

del receptor CB₂ en el modelo de ratones lesionados con LPS, pero no en el modelo de lesión con 6-OHDA, debido a que la toxina LPS produce primordialmente una respuesta inflamatoria, en lugar del efecto oxidativo que produce la 6-OHDA. Este hecho se confirma con un aumento del marcador microglial CD68, por la morfología de las células CB₂-positivas, similar a microglía como ocurre en el caso de los humanos y en los experimentos de Price *et al.* (2009) con MPTP, y por un aumento de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β y la enzima iNOS tras la lesión con LPS. En el modelo de ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* no hayamos tampoco un aumento en la expresión del receptor CB₂, seguramente debido a que este modelo no presentaba ninguna reactividad microglial. Como hemos dicho, es importante tener en cuenta que el receptor CB₂ se expresa de manera muy limitada en el cerebro sano, estando localizado preferentemente en los astrocitos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2010) y oligodendrocitos (Molina-Holgado *et al.*, 2002), y aparentemente ausente en células microgliales quiescentes (Sagredo *et al.*, 2009, Stella, 2010) excepto en varias subpoblaciones de microglía perivascular (Núñez *et al.*, 2004). Por el contrario, se sobreexpresa de manera muy intensa en microglía reclutada en los lugares de lesión, asociada al daño inflamatorio que se produce en las enfermedades neurodegenerativas (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010). Si asumimos que esta elevación del receptor CB₂ es un mecanismo protector endógeno, podemos pensar que la estimulación farmacológica de estos receptores puede reducir la respuesta inflamatoria. Así el inexistente aumento de la expresión del receptor CB₂ tras la lesión con 6-OHDA, quizá debido a que esta toxina no produce la muerte neuronal por inflamación como evento primario, sino que produce primordialmente daño oxidativo y disfunción mitocondrial que desencadenarían una respuesta inflamatoria muy secundaria, explicaría los experimentos fallidos en los que no se apreció neuroprotección mediante agonismo CB₂ en este modelo, mientras que sí se apreciaba neuroprotección con cannabinoides que estarían actuando a través de las propiedades antioxidantes intrínsecas de su estructura fenólica o mecanismos independientes de receptores CB₁ y CB₂ (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007), como podrían ser mecanismos mediados por PPAR (Sun *et al.*, 2007, Aleshin y Reiser, 2013) o a través de Nrf-2 (Juknat *et al.*, 2013).

Además de la presencia del receptor CB₂ en células gliales, también identificamos por vez primera la presencia de este receptor en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* humana, que apoyaría la idea de que los cannabinoides que pueden actuar sobre este receptor pueden influir de forma directa en la actividad de las neuronas dopaminérgicas, controlando su actividad sináptica. Aunque aún no había sido estudiada su presencia en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*, otros estudios han localizado al receptor CB₂ en ciertas subpoblaciones neuronales de los ganglios basales como la región palidotalámica de primates (Lanciego *et al.*, 2011), y en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral de ratón (Zhang *et al.*, 2014). Se trata, no obstante, de una distribución relativamente discreta y en zonas filogenéticamente antiguas del cerebro, sin el carácter de ubicuidad característico del receptor CB₁. Aunque Onaivi y sus colaboradores proponen una distribución más generalizada del receptor CB₂ (Gong *et al.*, 2006, Onaivi *et al.*, 2006, Brusco *et al.*, 2008, Onaivi *et al.*, 2008), sus hallazgos mediante técnicas inmunohistoquímicas son diferentes a sus resultados obtenidos mediante qRT-PCR (Atwood y Mackie, 2010) y además son cuestionados por la falta de controles negativos más estrictos como la tinción de las mismas regiones, bajo las mismas condiciones, de tejido procedente de ratones *knock-out* CB₂ (Köfalvi, 2007). En nuestro caso, para asegurarnos de la especificidad del anticuerpo utilizado, comprobamos que el marcaje observado era enmascarado por un péptido de bloqueo dirigido contra la zona N-terminal del receptor CB₂, demostrando así que no se debía a marcaje inespecífico del anticuerpo.

Encontramos que el marcaje de CB₂ neuronal fue significativamente menor en los pacientes de EP que en los individuos sanos, en concordancia con la reducción del número de neuronas dopaminérgicas típica de la enfermedad. Este marcaje también era de menor intensidad en las neuronas supervivientes, indicando así una posible relación entre su expresión y el transcurso de la patología. Quizá en un futuro pueda establecerse el receptor CB₂ nigral como biomarcador de la EP, ya que se dispone de ligandos fluorados para este receptor empleados en estudios de PET (Ahmad *et al.*, 2013). No obstante, sería necesaria una investigación más profunda en este ámbito.

También observamos células marcadas

con el anticuerpo anti-receptor CB₂ que no presentaban señal para IBA1 y cuya morfología no corresponde a neuronas. Teniendo en cuenta resultados obtenidos en otras enfermedades neurodegenerativas, como Huntington (Palazuelos *et al.*, 2009, Sagredo *et al.*, 2009) y ataxias cerebelosas autosómicas dominantes (Rodríguez-Cueto *et al.*, 2014), podría tratarse de astrocitos (Fernández-Ruiz *et al.*, 2007, Fernández-Ruiz *et al.*, 2010), aunque este hecho no ha sido confirmado en este estudio.

Potencial neuroprotector de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

Otro resultado que confirma el importante papel del receptor CB₂ en la defensa frente a los estímulos inflamatorios es que la lesión con la toxina LPS, no así con 6-OHDA, provoca en los ratones *knock-out* para este receptor un aumento en la microgliosis reactiva, los macrófagos infiltrados y una mayor pérdida de neuronas dopaminérgicas por efecto de la toxina. Todos estos hechos son indicativos de que el uso de agonistas CB₂ podría suponer una mejora en los parámetros relacionados con la inflamación, y, por tanto, en la supervivencia neuronal, justificando así su utilización como terapia en la EP. Numerosos estudios han investigado varias citoquinas (como TNF- α e IL-1 β) y enzimas (como iNOS, COX-2 y metaloproteinasas) por su papel en la respuesta proinflamatoria (Chiurchiu *et al.*, 2014). De hecho, el uso de cannabinoides con capacidad agonista CB₂ como HU-308 y Δ^9 -THCV disminuye los marcadores microgliales e inflamatorios en el modelo de LPS, en consonancia con el estudio de Romero-Sandoval y Eisenach (2007), donde reducen la microgliosis mediante la activación de CB₂ en un modelo de dolor agudo en ratas. Además, este efecto se pierde cuando se aplica el tratamiento a los ratones CB₂^{-/-}. Es importante remarcar que HU-308, y en menor medida Δ^9 -THCV, son capaces de disminuir los niveles de expresión de iNOS en el estriado de los ratones lesionados con LPS, efecto que no ocurre en la sustancia *nigra*, presumiblemente debido a que la inducción de esta enzima por la toxina en este área cerebral, resultó ser pequeña y estadísticamente no significativa. La importancia de reducir iNOS después de activar el receptor CB₂ reside en que esta enzima está presente en microglía y juega un papel importante en las respuestas neuroinflamatorias

que acontecen en la EP en pacientes (Knott *et al.*, 2000) y en modelos animales como ratones tratados con MPTP (Liberatore *et al.*, 1999) y ratas lesionadas con LPS (Arimoto y Bing, 2003, Choi *et al.*, 2009). Incluso, estudios preclínicos realizados con inhibidores de iNOS han demostrado frenar la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigrales (Choi *et al.*, 2009). Además, es importante resaltar que los terminales dopaminérgicos son muy sensibles al NO que genera esta enzima (Liberatore *et al.*, 1999), por lo que ésta reducción a través de la activación del receptor CB₂ es altamente relevante (Antunes *et al.*, 2002). Se confirma aquí una vez más el papel del receptor CB₂ en la respuesta antiinflamatoria (Buckley *et al.*, 2000, Mukhopadhyay *et al.*, 2010, Toguri *et al.*, 2014).

En ratones lesionados con LPS, Δ⁹-THCV no disminuye la activación microglial con la misma eficacia que el agonista selectivo CB₂ HU-308, debido a que el fitocannabinoide es agonista parcial de este receptor, pero confiere el mismo nivel de neuroprotección. Esta capacidad neuroprotectora de Δ⁹-THCV se le atribuye por su estructura fenólica, gracias a la que estaría mediando mecanismos antioxidantes independientes de unión al receptor CB₂. Mediante el uso del modelo de 6-OHDA, en el que el receptor CB₂ no aumenta su expresión tras la lesión y no parece ser diana de neuroprotección (García-Arencibia *et al.*, 2007), se puede comprobar el efecto del Δ⁹-THCV comparándolo con el obtenido por CBD, otro fitocannabinoide con efecto neuroprotector debido a su potencial antioxidante que no tiene afinidad por el receptor CB₂ (Lastres-Becker *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2007). Tras la administración crónica de Δ⁹-THCV a ratas lesionadas con 6-OHDA, la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriales se ve reducida, aunque a menor escala que tras el tratamiento crónico con CBD-BDS. Por lo que podemos afirmar que Δ⁹-THCV estaría ejerciendo neuroprotección en este modelo oxidativo a través de mecanismos que no implicarían la activación del receptor CB₂.

En cuanto a la posibilidad de implicar a los receptores PPAR_γ, nuestros resultados demuestran que el cannabinoide sintético VCE-003.2 mejora el comportamiento motor del modelo de lesión con 6-OHDA, y entre los mecanismos posibles estaría su capacidad agonista PPAR_γ, al igual que en los modelos de esclerosis múltiple y Huntington (Granja *et al.*,

2012, Díaz-Alonso *et al.*, 2016), y a una mayor supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. No obstante, esta recuperación fue pequeña en la medida que el daño en forma de reducción de neuronas TH-positivas fue también pequeño a pesar de las evidentes alteraciones a nivel motor. Otros estudios han mostrado que el CBG, molécula precursora del VCE 003.2, es capaz de mejorar los síntomas motores del modelo de Huntington de lesión con ácido 3-nitropropiónico (Valdeolivas *et al.*, 2015), una toxina oxidativa como la 6-OHDA. No podemos confirmar su efecto sobre la microgliosis ya que no se observaron ni una elevación de la inmunorreactividad para CD68 tras la lesión, ni una disminución significativa de este marcador en los ratones que habían sido tratados con VCE-003.2., y sería interesante estudiar la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF-α e IL-1β y la enzima iNOS para comprobar el efecto antiinflamatorio descrito por Carrillo-Salinas *et al.* (2014) en un modelo de encefalomielitis remeniscente de la esclerosis múltiple. También sería interesante comprobar el posible perfil antiinflamatorio del VCE-003.2 en el modelo de lesión con LPS y ver si estaría actuando a través de la vía NF-κB, como ya han demostrado otros agonistas PPAR en modelos de enfermedades inflamatorias, pero no en EP (Lin *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2015).

Aunque en esta Tesis Doctoral, la implicación de los receptores PPAR se ha asociado con los efectos del derivado VCE-003.2, se podría también extender a los efectos del Δ⁹-THCV. Se sabe que otros cannabinoides que actúan a través de los receptores PPAR son el Δ⁹-THC (O'Sullivan y Kendall, 2010) y el CBD (Scuderi *et al.*, 2014), por lo que es lógico pensar que el fitocannabinoide Δ⁹-THCV también podría activar estos receptores debido a las características que tienen en común estas tres moléculas, sumando esta cualidad a la lista de propiedades potencialmente beneficiosas que posee el Δ⁹-THCV para desarrollar un tratamiento polivalente frente a la EP.

En la fase sintomática de la EP, se produce un aumento de la expresión del receptor CB₁ (Fernández-Ruiz, 2009) y este incremento es compatible con el exceso de inhibición motora (aquinesia, rigidez, bradiquinesia) presente en la enfermedad, el uso de agonistas CB₁, además de los efectos psicotrópicos indeseados, agrava estos síntomas (Lastres-Becker *et al.*, 2005). Estas evidencias justifican el pensamiento de que

el uso de antagonistas del receptor CB₁ podría disminuir la sintomatología de la enfermedad, como se ha visto con rimonabant (Fernández-Espejo *et al.*, 2005, González *et al.*, 2006, Kelsey *et al.*, 2009), utilizado en nuestros experimentos como control positivo. Nuestro objetivo fue ver si Δ⁹-THCV también disminuía esos síntomas. En concreto, lo que observamos fue que el tratamiento agudo con Δ⁹-THCV a la dosis de 2 mg·kg⁻¹ era capaz de reducir la bradiquinesia en ratas parquinsonianas sin afectar al contenido en DA, sino que Δ⁹-THCV tendía a elevar los niveles de glutamato en el estriado, un efecto que puede estar asociado con el bloqueo de receptores CB₁ localizados en las terminales glutamatérgicas corticoestriatales, como ha sido descrito con rimonabant en experimentos de microdiálisis *in vivo* (García-Arencibia *et al.*, 2008), al contrario de la disminución de la liberación del neurotransmisor provocada por los agonistas del receptor CB₁ (Adermark *et al.*, 2009). Cualquier beneficio resultante del aumento de glutamato en el estriado debe estar mediado por receptores glutamatérgicos (por ejemplo, los receptores metabotrópicos de tipo III) localizados en las neuronas estriatopalidales que han sido propuestas como las causantes de los efectos parquinsonianos (Ossowska *et al.*, 2007). También es importante remarcar que este efecto excitatorio sobre la transmisión glutamatérgica era más intenso en condiciones de denervación dopaminérgica nigroestriatal (García-Arencibia *et al.*, 2008). Este hecho podría ser debido a que la denervación dopaminérgica del estriado puede afectar particularmente a los receptores CB₁ localizados en los terminales corticoestriatales, permitiendo un mayor control de la transmisión glutamatérgica por estos receptores en condiciones como las que se producen en la EP. Mediante autorradiografía e hibridación *in situ*, que no permiten una gran resolución, se encontró hace tiempo que esta denervación estaba asociada a una sobreexpresión del receptor CB₁ en diferentes subpoblaciones neuronales dentro del estriado (Mailleux y Vanderhaeghen, 1993, Lastres-Becker *et al.*, 2001). Además, el Δ⁹-THCV redujo los niveles de glutamato en la sustancia *nigra*. Probablemente, este efecto no dependa de la acción directa de Δ⁹-THCV sobre los receptores CB₁ de los terminales subtalmonigrales, sino de un mecanismo indirecto, Δ⁹-THCV bloquearía los receptores CB₁ de las terminales estriatopalidales mejorando la captura de GABA (Maneuf *et al.*, 1996), causando una menor

actividad de estas neuronas y, por consiguiente, una disminución en el tono inhibitorio de las neuronas GABAérgicas que proyectan desde el globo pálido al núcleo subtalámico. Todo esto daría como resultado una mayor inhibición de las neuronas subtalmonigrales, que disminuyen la liberación de glutamato. Al corregirse la hiperactividad subtalmonigral, se podría esperar que disminuyeran síntomas parquinsonianos como el temblor (Nagatsu y Sawada, 2007).

Una vez confirmado que Δ⁹-THCV posee potencial neuroprotector a la vez que puede servir puntualmente para aliviar los síntomas, nos propusimos investigar si este fitocannabinoide también disminuye la disquinesia asociada a levodopa en el modelo de parquinsonismo genético *aphakia*, tanto a nivel motor, como a nivel bioquímico. El uso de cannabinoides en este campo es controvertido, ya que no se conocen muy bien los mecanismos de actuación, pero parecen tener efectos beneficiosos tanto los agonistas como los antagonistas CB₁ (Ferrer *et al.*, 2003, Fabbrini *et al.*, 2007, Martínez *et al.*, 2012). Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con Δ⁹-THCV iniciado a la vez que el tratamiento con L-DOPA redujo las alteraciones comportamentales características de la disquinesia. Esto se acompañó de una normalización de dos parámetros bioquímicos representativos de esta situación, como FosB y pACh3. De hecho, demostramos por primera vez que estos ratones Pitx3^{-/-} presentan un aumento significativo del marcador de disquinesia pACh3 tras el tratamiento crónico con L-DOPA y que éste se ve disminuido cuando son tratados de manera conjunta con Δ⁹-THCV y L-DOPA. De forma preliminar nuestros resultados también sugieren que el Δ⁹-THCV podría ser útil en la reducción de la disquinesia una vez ésta ya se ha establecido, aunque en ese caso no hemos investigado ningún posible sustrato neuroquímico. Por tanto, estos resultados apoyan la posibilidad de desarrollar un tratamiento de Δ⁹-THCV combinado con dosis menos pro-disquinéticas de L-DOPA, que además de retrasar la aparición de los efectos secundarios de la terapia de reemplazo dopaminérgica, aporte un grado de neuroprotección a las neuronas nigroestriatales, en la línea de los estudios de Gutiérrez-Valdez *et al.* (2013) con rimonabant.

Esta idea de combinación con otros fármacos es la base de la posibilidad de desarrollar un tratamiento polivalente para la EP. Δ⁹-THCV

puede ser un buen candidato por su capacidad neuroprotectora mediante agonismo CB₂, posible agonismo PPAR y capacidad antioxidante, y por la disminución de los síntomas motores, incluida la disquinesia, mediante su perfil antagonista CB₁. En este último caso, se podría combinar con L-DOPA (a dosis menos pro-disquinéticas como se ha dicho anteriormente).

A nivel de neuroprotección, se podría combinar Δ⁹-THCV con CBD, que podrían tener un efecto sinérgico de forma que se podría obtener un mayor grado de neuroprotección mediante el agonismo CB₂ y posible PPAR de Δ⁹-THCV y la capacidad antioxidante de ambos. Además, Δ⁹-THCV puede producir un importante alivio de los síntomas gracias a su antagonismo CB₁, que le aportaría una ventaja añadida frente al CBD.

Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con cannabinoides en el modelo LRRK2-G2019S

El último de los objetivos de esta Tesis Doctoral se planteó con el fin de investigar el potencial antiinflamatorio/neuroprotector de los receptores CB₂ en un modelo genético de EP, un hecho que no había sido estudiado hasta ahora, quizá debido a que los modelos de EP genéticos de sobreexpresión de proteínas mutantes como α-sinucleína y PINK-1, o *knock-out* para α-sinucleína y parkina, no parecen presentar un importante nivel de gliosis que produzca los eventos inflamatorios necesarios (González *et al.*, 2005, García-Arencibia *et al.*, 2009). Se eligió el modelo de los ratones transgénicos LRRK2-G2019S, cuya mutación es la causa más prevalente de parkinsonismo autosómico dominante de inicio tardío, aunque alteraciones en esta quinasa aparecen también en diferentes casos de parkinsonismo esporádico (Khan *et al.*, 2005). Además, LRRK2 está altamente expresada en microglía y se ha propuesto que interviene en la respuesta inflamatoria (Gillardon *et al.*, 2012, Moehle *et al.*, 2012, López de Maturana *et al.*, 2014). Incluso, dado que se expresa en macrófagos y células del sistema inmune, y su relación con enfermedades con inflamación periférica (por ejemplo, enfermedad de Crohn), se empieza a pensar que los efectos parkinsonianos derivados de las mutaciones en LRRK2 podrían iniciarse en la periferia y alcanzar el SNC a través de la barrera hematoencefálica, que estaría comprometida (Greggio *et al.*, 2012). Por tanto, parecía interesante investigar una posible terapia antiinflamatoria basada en

la activación del receptor CB₂, sobre todo si éste se encontrara sobreexpresado en la microglía de los ratones LRRK2-G2019S.

La caracterización fenotípica de estos ratones había sido llevada a cabo por Ramonet *et al.* (2011), pero nuestros resultados mostraron que el déficit motor era muy leve, con anomalías en coordinación y fuerza muscular, principalmente. Tampoco detectamos la degeneración nigral esperada a los 18 meses de edad mediante técnicas inmunohistoquímicas. Hecho que puede justificarse sabiendo que Ramonet *et al.* (2011) encontraron esta neurodegeneración, mediante técnicas estereológicas, mucho más sensibles, a la edad de 19-20 meses y que no fue muy elevada (en torno al 20%). Una prueba alternativa, sería el análisis de niveles de DA, pero Ramonet *et al.* (2011) no encontraron diferencias en el estriado. Aunque otros autores tampoco han encontrado cambios en el número de neuronas TH-positivas en los ganglios basales de distintos modelos murinos basados en mutaciones de LRRK2 (García-Miralles *et al.*, 2015, Shaikh *et al.*, 2015, Yue *et al.*, 2015).

Desafortunadamente tampoco encontramos una disminución de las células de Purkinje en el cerebelo que justificara la falta de coordinación. Aunque no descartamos que otras áreas del sistema nervioso, puedan estar implicadas en la debilidad muscular, como la médula espinal y las motoneuronas espinales, que son las que degeneran en enfermedades neuromusculares, incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, que son los típicos modelos animales que presentan una peor realización del *test* de la percha (Ferry *et al.*, 2014). Desgraciadamente, estos tejidos no estaban ya disponibles cuando observamos la ausencia de degeneración de los ganglios basales.

No encontramos cambios significativos en cuanto a microgliosis [Ramonet *et al.* (2011) los habían encontrado en astrogliosis] ni en cuanto al marcador ALDH1A1, asociado a las fases iniciales de la enfermedad, en los ganglios basales. Tampoco en los marcadores de inflamación COX-2 y TNF-α (Teismann *et al.*, 2003, De Lella Ezcurra *et al.*, 2010), ni siquiera cuando se supone que LRRK2 podría estar regulando a COX-2 (López de Maturana *et al.*, 2014). La única anomalía encontrada fue un aumento de la expresión de LAMP-1, que es una proteína lisosomal implicada en la formación de autofagosomas, por lo que podría indicar

alteraciones en la autofagia como las encontradas en este mismo modelo (Ramonet *et al.*, 2011) y en el modelo de α -sinucleína (Plowey y Chu, 2011), similar al modelo de LRRK2. También se ha encontrado un aumento de LAMP-1 en los fibroblastos procedentes de pacientes de EP con la mutación G2019S (Hockey *et al.*, 2015) y en un modelo experimental de esclerosis lateral amiotrófica (Oliván *et al.*, 2015) caracterizado por sufrir debilidad muscular, como ocurre en nuestros ratones.

El Sistema Endocannabinoide de estos ratones ha sido caracterizado por vez primera en nuestro estudio, sin obtener diferencias en la expresión de los elementos clave de este sistema en las tres edades y estructuras estudiadas. En este modelo no encontramos la sobreexpresión del receptor CB₂ asociada a gliosis que esperábamos, al menos en los ganglios basales, lo que se explica por la ausencia de reactividad glial en el ratón transgénico. La única diferencia que encontramos fue un aumento en la expresión de MAGL en la sustancia *nigra* de los ratones transgénicos a los 6 meses de edad pero esta diferencia desaparece con el tiempo y no parece relevante. También encontramos esta sobreexpresión en el estriado de los ratones *knock-out* para Pitx3, que podría estar relacionada con una disminución de los endocannabinoides disponibles en el organismo, AEA y 2-AG, lo que agravaría la neurodegeneración como ocurre en otras enfermedades del SNC (Cabranes *et al.*, 2005). Tampoco en otros modelos de Parkinson genético, como *Pink1*^{-/-} aparecen cambios en el Sistema Endocannabinoide (Madeo *et al.*, 2016). Quizá este sistema se encuentre alterado en alguna otra estructura del SNC que pueda estar siendo dañada y esté relacionada con el control de la actividad motora, pero es especialmente llamativo que no encontráramos la sobreexpresión del receptor CB₂ que aparece asociado a gliosis en modelos de EP, como el de LPS o MPTP (Price *et al.*, 2009, Concannon *et al.*, 2015), y en pacientes, como hemos visto en el tejido de humanos. Aunque, como se ha dicho antes, podría justificarse por la ausencia de microgliosis encontrada en nuestro caso, aunque Ramonet *et al.* (2011) sí detectaron cierta astrogliosis.

A pesar de no encontrar una regulación al alza de los receptores CB₂, la activación de estos receptores con HU-308 y Δ^9 -THCV tuvo algunos efectos positivos, por ejemplo, mejoró la fuerza muscular de los ratones transgénicos,

acompañada de una normalización de la autofagia por reducción de los niveles de LAMP-1. Mientras que el bloqueo del receptor CB₂ con el antagonista selectivo revirtió este efecto asociado a un agravamiento del fenotipo motor de los ratones *LRRK2*-G2019S en el actímetro y, sobre todo, en la fuerza muscular. Todo esto apoyaría la idea de que una activación del receptor CB₂ podría corregir un potencial malfuncionamiento neuronal reflejado en una respuesta autofágica anómala. Estudios previos han confirmado la relación entre la activación de los receptores CB₂ y su efecto sobre la autofagia en condiciones patológicas, como cáncer y esclerosis múltiple (Hiebel y Behl, 2015), pero nuestro estudio es el primero en relacionarlo en un modelo de EP, aunque sería necesaria una mayor profundización mediante el análisis de marcadores de autofagia como p62 y LC3 (Marx, 2015). Sin embargo, como se ha mencionado, este efecto puede no estar necesariamente relacionado con el desarrollo de parkinsonismo o daño/malfuncionamiento sináptico a nivel de los ganglios basales, por lo que los receptores CB₂ sobre los que estarían actuando los agonistas pueden encontrarse en otras regiones del SNC que sería necesario estudiar con mayor detalle en un futuro.

En definitiva, nuestros datos apoyan la relevancia del receptor CB₂ como diana central para el desarrollo de una terapia farmacológica multifactorial frente a la EP. Esta enfermedad es tratada a nivel de sintomatología, principalmente, con la terapia de reemplazo dopaminérgica, pero aún no se conoce la forma de frenar o retrasar la degeneración nigroestriatal. Aquí proponemos desarrollar un tratamiento que cubra varios frentes a la vez; que aporte neuroprotección mediante la actividad antiinflamatoria de los agonistas CB₂ y PPAR, y la actividad antioxidante de los cannabinoides con estructura fenólica, y que alivie los síntomas mediante el antagonismo CB₁. Dado que el tratamiento con L-DOPA posee muchos más beneficios que inconvenientes, el tratamiento con cannabinoides podría ser complementario, ayudando a retrasar la aparición de la disquinesia, ya que quizá sería posible el uso de dosis más bajas de levodopa, o a aliviar los síntomas disquinéticos cuando estos han aparecido. Después de esta investigación, creemos que el fitocannabinoide Δ^9 -THCV es un buen candidato para formar parte de esta terapia, por poseer un perfil farmacológico que cumple con los requisitos necesarios, y

porque además, se podría combinar con otros compuestos afines con los que podría actuar de forma sinérgica como podrían ser el CBD o VCE-003.2, aunque el desarrollo de esta posible estrategia farmacológica necesita ser estudiada con mayor detalle.



CONCLUSIONES



I. Análisis de los cambios en el receptor CB_2 en la Enfermedad de Parkinson

- La expresión del receptor CB_2 se encuentra elevada en la microglía de la sustancia *nigra* de los pacientes de la Enfermedad de Parkinson. Esta elevación se reproduce en el modelo experimental animal basado en la lesión con LPS, pero no en el modelo de lesión con 6-OHDA.
- El receptor CB_2 se comporta como posible diana neuroprotectora de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* frente a los estímulos inflamatorios de la lesión con LPS.
- Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* humana expresan receptores CB_2 . Esta expresión tiene menor intensidad en las neuronas dopaminérgicas de los pacientes afectados por la Enfermedad de Parkinson.

II. Potencial terapéutico de los cannabinoides en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson y su efecto sobre algunos síntomas

- Los cannabinoides con capacidad agonista CB_2 y/o antioxidante previenen la degeneración dopaminérgica disminuyendo la inflamación en el modelo de lesión con LPS.
- El cannabinoide sintético VCE-003.2 con capacidad agonista PPAR γ disminuye los síntomas motores y posee cierto grado de neuroprotección en el modelo experimental de lesión con 6-OHDA.
- Los cannabinoides con capacidad antagonista CB_1 disminuyen los síntomas motores en el modelo de lesión con 6-OHDA, presumiblemente mediante un aumento del contenido de glutamato en el estriado, y una disminución en la sustancia nigra.
- El fitocannabinoide Δ^9 -tetrahidrocannabivarina disminuye las anomalías motoras y los marcadores de disquinesia asociada a levodopa, en los ratones del modelo de Parkinson genético *aphakia*.

III. Caracterización del Sistema Endocannabinoide y tratamiento con agonistas CB_2 en el modelo *LRRK2-G2019S*

- Los ratones transgénicos del modelo de Parkinson genético *LRRK2-G2019S* muestran un fenotipo motor muy leve, presentando únicamente menor coordinación y fuerza muscular. Estos cambios no están asociados a daño nigroestriatal o cerebelar, ni inflamación en los ganglios basales, pero sí a un aumento de la autofagia en estriado y sustancia *nigra*.
- El tratamiento de los ratones transgénicos *LRRK2-G2019S* con agonistas CB_2 mejora la coordinación motora y fuerza muscular y disminuye la autofagia.



BIBLIOGRAFÍA



Abadji, V., S. Lin, G. Taha, G. Griffin, L. A. Stevenson, R. G. Pertwee, A. Makriyannis (1994). (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. J Med Chem **37**: 1889-1893.

Aboud, M. E. (2016). "Allosteric Modulators: A Side Door." J Med Chem **59**(1): 42-43.

Adermark, L., G. Talani, D. M. Lovinger (2009). "Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity." Eur J Neurosci **29**(1): 32-41.

Aguado, T., A. Carracedo, B. Julien, G. Velasco, G. Milman, R. Mechoulam, L. Alvarez, M. Guzman and I. Galve-Roperh (2007). "Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis." J Biol Chem **282**(9): 6854-6862.

Aguado, T., K. Monory, J. Palazuelos, N. Stella, B. Cravatt, B. Lutz, G. Marsicano, Z. Kokaia, M. Guzman, I. Galve-Roperh (2005). "The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation." FASEB J **19**(12): 1704-1706.

Aguado, T., E. Romero, K. Monory, J. Palazuelos, M. Sendtner, G. Marsicano, B. Lutz, M. Guzman, I. Galve-Roperh (2007). "The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis." J Biol Chem **282**(33): 23892-23898.

Ahern, G. P. (2003). "Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide." J Biol Chem **278**(33): 30429-30434.

Ahmad, R., M. Koole, N. Evens, K. Serdons, A. Verbruggen, G. Bormans, K. Van Laere (2013). "Whole-body biodistribution and radiation dosimetry of the cannabinoid type 2 receptor ligand [¹¹C]-NE40 in healthy subjects." Mol Imaging Biol **15**(4): 384-390.

Aizpurua-Olaizola, O., J. Omar, P. Navarro, M. Olivares, N. Etxebarria, A. Usobiaga (2014). "Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry." Anal Bioanal Chem **406**(29): 7549-7560.

Alam, Z. I., S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden, P. Jenner, B. Halliwell (1997). "A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease." J Neurochem **69**(3): 1326-1329.

Alam, Z. I., A. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, N. Cairns, C. D. Marsden, P. Jenner, B. Halliwell (1997). "Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra." J Neurochem **69**(3): 1196-1203.

Aleshin, S., G. Reiser (2013). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR)-alpha, beta/delta and gamma triad in regulation of reactive oxygen species signaling in brain." Biol Chem **394**(12): 1553-1570.

Alvarez-Erviti, L., M. C. Rodriguez-Oroz, J. M. Cooper, C. Caballero, I. Ferrer, J. A. Obeso, A. H. Schapira (2010). "Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains." Arch Neurol **67**(12): 1464-1472.

Alvarez-Fischer, D., C. Henze, C. Strenzke, J. Westrich, B. Ferger, G. U. Hoglinger, W. H. Oertel, A. Hartmann (2008). "Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice." Exp Neurol **210**(1): 182-193.

Allan, S. M., N. J. Rothwell (2001). "Cytokines and acute neurodegeneration." Nat Rev Neurosci **2**(10): 734-744.

Antunes, F., D. Han, D. Rettori, E. Cadenas (2002). "Mitochondrial damage by nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells." Biochim Biophys Acta **1556**(2-3): 233-238.

Appendino, G., M. L. Bellido , B. E. Muñoz (2015). Novel cannabigerol derivatives, Google Patents.

Arévalo-Martín, A., D. García-Ovejero, Y. Sierra-Palomares, B. Paniagua-Torija, I. González-Gil, S. Ortega-Gutierrez and E. Molina-Holgado (2012). "Early endogenous activation of CB1 and CB2 receptors after spinal cord injury is a protective response involved in spontaneous recovery." PLoS One **7**(11): e49057.

Arévalo-Martín, A., E. Molina-Holgado , D. García-Ovejero (2016). "Cannabinoids to treat spinal cord injury." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **64**: 190-199.

Arimoto, T. , G. Bing (2003). "Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration." Neurobiol Dis **12**(1): 35-45.

Arjmand, S., Z. Vaziri, M. Behzadi, H. Abbassian, G. J. Stephens , M. Shabani (2015). "Cannabinoids and Tremor Induced by Motor-related Disorders: Friend or Foe?" Neurotherapeutics **12**(4): 778-787.

Arjona, V., A. Minguez-Castellanos, R. J. Montoro, A. Ortega, F. Escamilla, J. J. Toledo-Aral, R. Pardal, S. Mendez-Ferrer, J. M. Martin, M. Perez, M. J. Katati, E. Valencia, T. Garcia , J. Lopez-Barneo (2003). "Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease." Neurosurgery **53**(2): 321-328; discussion 328-330.

Armengol Butrón de Mújica, J. A., Miñano Sánchez, F. J. (1995). Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso, Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla.

Ashton, J. C. , M. Glass (2007). "The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration." Curr Neuroparmacol **5**(2): 73-80.

Atwood, B. K. , K. Mackie (2010). "CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis." Br J Pharmacol **160**(3): 467-479.

Backlund, E. O., P. O. Granberg, B. Hamberger, E. Knutsson, A. Martensson, G. Sedvall, A. Seiger , L. Olson (1985). "Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials." J Neurosurg **62**(2): 169-173.

Bagga, V., S. B. Dunnett , R. A. Fricker (2015). "The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease - Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions." Behav Brain Res **288**: 107-117.

Baillie, G. L., J. G. Horswill, S. Anavi-Goffer, P. H. Reggio, D. Bolognini, M. E. Abood, S. McAllister, P. G. Strange, G. J. Stephens, R. G. Pertwee , R. A. Ross (2013). "CB(1) receptor allosteric modulators display both agonist and signaling pathway specificity." Mol Pharmacol **83**(2): 322-338.

Barker, R. A. , H. Widner (2004). "Immune problems in central nervous system cell therapy." NeuroRx **1**(4): 472-481.

Basavarajappa, B. S. (2007). "Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism." Protein Pept Lett **14**(3): 237-246.

Begg, M., P. Pacher, S. Batkai, D. Osei-Hyiaman, L. Offertaler, F. M. Mo, J. Liu , G. Kunos (2005). "Evidence for novel cannabinoid receptors." Pharmacol Ther **106**(2): 133-145.

Beltramo, M., N. Stella, A. Calignano, S. Y. Lin, A. Makriyannis , D. Piomelli (1997). "Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition." Science **277**(5329): 1094-1097.

Benard, G., F. Massa, N. Puente, J. Lourenco, L. Bellocchio, E. Soria-Gomez, I. Matias, A. Delamarre, M. Metna-Laurent, A. Cannich, E. Hebert-Chatelain, C. Mülle, S. Ortega-Gutierrez, M. Martin-Fontecha, M. Klugmann, S. Guggenhuber, B. Lutz, J. Gertsch, F. Chaouloff, M. L. Lopez-Rodriguez, P. Grandes, R. Rossignol , G. Marsicano (2012). "Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism." Nat Neurosci **15**(4): 558-564.

- Benito, C., W. K. Kim, I. Chavarria, C. J. Hillard, K. Mackie, R. M. Tolon, K. Williams, J. Romero (2005). "A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis." *J Neurosci* **25**(10): 2530-2536.
- Benito, C., E. Nunez, R. M. Tolon, E. J. Carrier, A. Rabano, C. J. Hillard, J. Romero (2003). "Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains." *J Neurosci* **23**(35): 11136-11141.
- Benito, C., J. P. Romero, R. M. Tolón, D. Clemente, F. Docagne, C. J. Hillard, C. Guaza and J. Romero (2007). "Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis." *J Neurosci* **27**(9): 2396-2402.
- Benito, C., R. M. Tolón, M. R. Pazos, E. Núñez, A. I. Castillo, J. Romero (2008). "Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation." *Br J Pharmacol* **153**(2): 277-285.
- Bernheimer, H., W. Birkmayer, O. Hornykiewicz, K. Jellinger, F. Seitelberger (1973). "Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations." *J Neurol Sci* **20**(4): 415-455.
- Bevan, M. D., P. J. Magill, D. Terman, J. P. Bolam, C. J. Wilson (2002). "Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network." *Trends Neurosci* **25**(10): 525-531.
- Bezard, E., J. M. Brotchie, C. E. Gross (2001). "Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: potential for new therapies." *Nat Rev Neurosci* **2**(8): 577-588.
- Bezard, E., C. E. Gross, J. M. Brotchie (2003). "Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated." *Trends Neurosci* **26**(4): 215-221.
- Bezard, E., S. Przedborski (2011). "A tale on animal models of Parkinson's disease." *Mov Disord* **26**(6): 993-1002.
- Birkmayer, W., O. Hornykiewicz (1961). "[The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]." *Wien Klin Wochenschr* **73**: 787-788.
- Bisogno, T., F. Berrendero, G. Ambrosino, M. Cebeira, J. A. Ramos, J. J. Fernández-Ruiz, V. Di Marzo (1999). "Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function." *Biochem Biophys Res Commun* **256**(2): 377-380.
- Bisogno, T., V. Di Marzo (2008). "The role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: facts and hypotheses." *Curr Pharm Des* **14**(23): 2299-3305.
- Bisogno, T., L. Hanus, L. De Petrocellis, S. Tchilibon, D. E. Ponde, I. Brandi, A. S. Moriello, J. B. Davis, R. Mechoulam, V. Di Marzo (2001). "Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide." *Br J Pharmacol* **134**(4): 845-852.
- Bisogno, T., A. Ligresti, V. Di Marzo (2005). "The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects." *Pharmacol Biochem Behav* **81**(2): 224-238.
- Björklund, A., D. Kirik, C. Rosenblad, B. Georgievska, C. Lundberg, R. J. Mandel (2000). "Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model." *Brain Res* **886**(1-2): 82-98.
- Blandini, F., M. T. Armentero, E. Martignoni (2008). "The 6-hydroxydopamine model: news from the past." *Parkinsonism Relat Disord* **14 Suppl 2**: S124-129.
- Blankman, J. L., G. M. Simon, B. F. Cravatt (2007). "A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." *Chem Biol* **14**(12): 1347-1356.
- Blázquez, C., A. Chiarlone, L. Bellocchio, E. Resel, P. Pruunsild, D. García-Rincon, M. Sendtner, T. Timmusk, B. Lutz, I. Galve-Roperh, M. Guzmán (2015). "The CB(1) cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway." *Cell Death Differ* **22**(10): 1618-1629.

Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A. L. Benabid, R. Sadoul, J. M. Verna (2001). "Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease." Prog Neurobiol **65**(2): 135-172.

Blumenfeld, H. (2010). Neuroanatomy through clinical cases, Sinauer Associates.

Bolognini, D., B. Costa, S. Maione, F. Comelli, P. Marini, V. Di Marzo, D. Parolaro, R. A. Ross, L. A. Gauson, M. G. Cascio, R. G. Pertwee (2010). "The plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabinol can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice." Br J Pharmacol **160**(3): 677-687.

Bonaventura, J., A. J. Rico, E. Moreno, S. Sierra, M. Sanchez, N. Luquin, D. Farre, C. E. Muller, E. Martinez-Pinilla, A. Cortes, J. Mallol, M. T. Armentero, A. Pinna, E. I. Canela, C. Lluís, P. J. McCormick, J. L. Lanciego, V. Casado, R. Franco (2014). "L-DOPA-treatment in primates disrupts the expression of A(2A) adenosine-CB(1) cannabinoid-D(2) dopamine receptor heteromers in the caudate nucleus." Neuropharmacology **79**: 90-100.

Bonhaus, D. W., L. K. Chang, J. Kwan, G. R. Martin (1998). "Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses." J Pharmacol Exp Ther **287**(3): 884-888.

Borges, R. S., J. Batista, Jr., R. B. Viana, A. C. Baetas, E. Orestes, M. A. Andrade, K. M. Honório, A. B. da Silva (2013). "Understanding the molecular aspects of tetrahydrocannabinol and cannabidiol as antioxidants." Molecules **18**(10): 12663-12674.

Bouaboula, M., B. Bourrie, M. Rinaldi-Carmona, D. Shire, G. Le Fur, P. Casellas (1995). "Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells." J Biol Chem **270**(23): 13973-13980.

Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, J. Marchand, X. Canat, B. Bourrie, M. Rinaldi-Carmona, B. Calandra, G. Le Fur, P. Casellas (1996). "Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression." Eur J Biochem **237**(3): 704-711.

Bouhrel, M. A., J. Brozek, B. Derudas, C. Zawadzki, B. Jude, B. Staels, G. Chinetti-Gbaguidi (2009). "Unlike PPARgamma, PPARalpha or PPARbeta/delta activation does not promote human monocyte differentiation toward alternative macrophages." Biochem Biophys Res Commun **386**(3): 459-462.

Braak, H., K. Del Tredici, U. Rub, R. A. de Vos, E. N. Jansen Steur, E. Braak (2003). "Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **24**(2): 197-211.

Branchi, I., I. D'Andrea, M. Armida, T. Cassano, A. Pezzola, R. L. Potenza, M. G. Morgese, P. Popoli, E. Allea (2008). "Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model." J Neurosci Res **86**(9): 2050-2061.

Breese, G. R., T. D. Traylor (1971). "Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine." Br J Pharmacol **42**(1): 88-99.

Bright, J. J., S. Kanakasabai, W. Chearwae, S. Chakraborty (2008). "PPAR Regulation of Inflammatory Signaling in CNS Diseases." PPAR Res **2008**: 658520.

Brotchie, J. M. (2003). "CB1 cannabinoid receptor signalling in Parkinson's disease." Curr Opin Pharmacol **3**(1): 54-61.

Brundin, P., J. Y. Li, J. L. Holton, O. Lindvall, T. Revesz (2008). "Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread." Nat Rev Neurosci **9**(10): 741-745.

Brusco, A., P. Tagliaferro, T. Saez, E. S. Onaivi (2008). "Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus." Synapse **62**(12): 944-949.

Buckley, N. E. (2008). "The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update." British Journal of Pharmacology **153**(2): 309-318.

Buckley, N. E., K. L. McCoy, É. Mezey, T. Bonner, A. Zimmer, C. C. Felder, M. Glass, A. Zimmer (2000). "Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor." European Journal of Pharmacology **396**(2-3): 141-149.

Buggy, Y., V. Cornelius, L. Wilton, S. A. Shakir (2011). "Risk of depressive episodes with rimonabant: a before and after modified prescription event monitoring study conducted in England." Drug Saf **34**(6): 501-509.

Busquets-García, A., E. Puighearnal, A. Pastor, R. de la Torre, R. Maldonado, A. Ozaita (2011). "Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses." Biol Psychiatry **70**(5): 479-486.

Butovsky, E., A. Juknat, I. Goncharov, J. Elbaz, R. Eilam, A. Zangen, Z. Vogel (2005). "In vivo up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to Delta-tetrahydrocannabinol." J Neurochem **93**(4): 802-811.

Cabral, G. A., A. Staab (2005). "Effects on the immune system." Handb Exp Pharmacol(168): 385-423.

Cabranes, A., K. Venderova, E. de Lago, F. Fezza, A. Sanchez, L. Mestre, M. Valenti, A. Garcia-Merino, J. A. Ramos, V. Di Marzo, J. Fernandez-Ruiz (2005). "Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis." Neurobiol Dis **20**(2): 207-217.

Cadogan, A. K., S. P. Alexander, E. A. Boyd, D. A. Kendall (1997). "Influence of cannabinoids on electrically evoked dopamine release and cyclic AMP generation in the rat striatum." J Neurochem **69**(3): 1131-1137.

Callen, L., E. Moreno, P. Barroso-Chinea, D. Moreno-Delgado, A. Cortes, J. Mallol, V. Casado, J. L. Lanciego, R. Franco, C. Lluís, E. I. Canela, P. J. McCormick (2012). "Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain." J Biol Chem **287**(25): 20851-20865.

Capasso, R., A. A. Izzo, F. Fezza, A. Pinto, F. Capasso, N. Mascolo, V. Di Marzo (2001). "Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice." Br J Pharmacol **134**(5): 945-950.

Carlisle, S. J., F. Marciano-Cabral, A. Staab, C. Ludwick, G. A. Cabral (2002). "Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation." Int Immunopharmacol **2**(1): 69-82.

Carlsson, A., M. Lindqvist, T. Magnusson (1957). "3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists." Nature **180**(4596): 1200.

Carlsson, A., M. Lindqvist, T. Magnusson, B. Waldeck (1958). "On the presence of 3-hydroxytyramine in brain." Science **127**(3296): 471.

Carriba, P., O. Ortiz, K. Patkar, Z. Justinova, J. Stroik, A. Themann, C. Muller, A. S. Woods, B. T. Hope, F. Ciruela, V. Casado, E. I. Canela, C. Lluís, S. R. Goldberg, R. Moratalla, R. Franco, S. Ferre (2007). "Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids." Neuropsychopharmacology **32**(11): 2249-2259.

Carrier, E. J., J. A. Auchampach, C. J. Hillard (2006). "Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7895-7900.

Carrier, E. J., C. S. Kearn, A. J. Barkmeier, N. M. Breese, W. Yang, K. Nithipatikom, S. L. Pfister, W. B. Campbell, C. J. Hillard (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." Mol Pharmacol **65**(4): 999-1007.

Carrillo-Salinas, F. J., C. Navarrete, M. Mecha, A. Feliu, J. A. Collado, I. Cantarero, M. L. Bellido, E. Munoz, C. Guaza (2014). "A cannabigerol derivative suppresses immune responses and protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis." PLoS One **9**(4): e94733.

Carroll, C. B., P. G. Bain, L. Teare, X. Liu, C. Joint, C. Wroath, S. G. Parkin, P. Fox, D. Wright, J. Hobart, J. P. Zajicek (2004). "Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study." Neurology **63**(7): 1245-1250.

Casarejos, M. J., J. Perucho, A. Gomez, M. P. Munoz, M. Fernandez-Estevez, O. Sagredo, J. Fernandez Ruiz, M. Guzman, J. G. de Yebenes, M. A. Mena (2013). "Natural cannabinoids improve dopamine neurotransmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy." J Alzheimers Dis **35**(3): 525-539.

Castillo, A., M. R. Tolón, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, J. Martínez-Orgado (2010). "The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors." Neurobiol Dis **37**(2): 434-440.

Castillo, P. E., T. J. Younts, A. E. Chavez, Y. Hashimoto-dani (2012). "Endocannabinoid signaling and synaptic function." Neuron **76**(1): 70-81.

Citraro, R., E. Russo, F. Scicchitano, C. M. van Rijn, D. Cosco, C. Avagliano, R. Russo, G. D'Agostino, S. Petrosino, F. Guida, L. Gatta, G. van Luijcklaar, S. Maione, V. Di Marzo, A. Calignano, G. De Sarro (2013). "Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR-alpha receptor activation in a genetic model of absence epilepsy." Neuropharmacology **69**: 115-126.

Comelli, F., G. Giagnoni, I. Bettoni, M. Colleoni, B. Costa (2007). "The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation." Br J Pharmacol **152**(5): 787-794.

Concannon, R. M., B. N. Okine, D. P. Finn, E. Dowd (2015). "Differential upregulation of the cannabinoid CB(2) receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease." Exp Neurol **269**: 133-141.

Concannon, R. M., B. N. Okine, D. P. Finn, E. Dowd (2016). "Upregulation of the cannabinoid CB2 receptor in environmental and viral inflammation-driven rat models of Parkinson's disease." Exp Neurol.

Connolly, B. S., A. E. Lang (2014). "Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review." JAMA **311**(16): 1670-1683.

Conti, S., B. Costa, M. Colleoni, D. Parolaro, G. Giagnoni (2002). "Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat." Br J Pharmacol **135**(1): 181-187.

Correa, F., F. Docagne, L. Mestre, F. Loria, M. Hernangomez, J. Borrell, C. Guaza (2007). "Cannabinoid system and neuroinflammation: implications for multiple sclerosis." Neuroimmunomodulation **14**(3-4): 182-187.

Correa, F., L. Mestre, E. Molina-Holgado, A. Arevalo-Martin, F. Docagne, E. Romero, F. Molina-Holgado, J. Borrell, C. Guaza (2005). "The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation." Mini Rev Med Chem **5**(7): 671-675.

Cravatt, B. F., D. K. Giang, S. P. Mayfield, D. L. Boger, R. A. Lerner, N. B. Gilula (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." Nature **384**(6604): 83-87.

Cravatt, B. F., A. H. Lichtman (2004). "The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior." J Neurobiol **61**(1): 149-160.

Crawley, J. N. (1999). "Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests1." Brain Research **835**(1): 18-26.

- Cristiano, L., A. Bernardo, M. P. Ceru (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and peroxisomes in rat cortical and cerebellar astrocytes." *J Neurocytol* **30**(8): 671-683.
- Cuadrado, A., P. Moreno-Murciano, J. Pedraza-Chaverri (2009). "The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease." *Expert Opin Ther Targets* **13**(3): 319-329.
- Chagas, M. H., J. A. Crippa, A. W. Zuardi, J. E. Hallak, J. P. Machado-de-Sousa, C. Hirotsu, L. Maia, S. Tufik, M. L. Andersen (2013). "Effects of acute systemic administration of cannabidiol on sleep-wake cycle in rats." *J Psychopharmacol* **27**(3): 312-316.
- Charcôt, J. M. (1872). De la paralysie agitante. *Oeuvres Complètes. Leçons sur les maladies du système nerveux*. Paris, Delahaye A. **1**: 155-188.
- Chawla, A. (2010). "Control of macrophage activation and function by PPARs." *Circ Res* **106**(10): 1559-1569.
- Chen, C. Y., Y. H. Weng, K. Y. Chien, K. J. Lin, T. H. Yeh, Y. P. Cheng, C. S. Lu, H. L. Wang (2012). "(G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD." *Cell Death Differ* **19**(10): 1623-1633.
- Chen, J. J., D. M. Swope, K. Dashtipour, K. E. Lyons (2009). "Transdermal rotigotine: a clinically innovative dopamine-receptor agonist for the management of Parkinson's disease." *Pharmacotherapy* **29**(12): 1452-1467.
- Chen, R., J. Zhang, N. Fan, Z. Q. Teng, Y. Wu, H. Yang, Y. P. Tang, H. Sun, Y. Song, C. Chen (2013). "Delta9-THC-caused synaptic and memory impairments are mediated through COX-2 signaling." *Cell* **155**(5): 1154-1165.
- Chiurchiu, V., M. Lanuti, G. Catanzaro, F. Fezza, C. Rapino, M. Maccarrone (2014). "Detailed characterization of the endocannabinoid system in human macrophages and foam cells, and anti-inflammatory role of type-2 cannabinoid receptor." *Atherosclerosis* **233**(1): 55-63.
- Chiurchiu, V., A. Leuti, M. Maccarrone (2015). "Cannabinoid Signaling and Neuroinflammatory Diseases: A Melting pot for the Regulation of Brain Immune Responses." *J Neuroimmune Pharmacol* **10**(2): 268-280.
- Choi, D. Y., M. Liu, R. L. Hunter, W. A. Cass, J. D. Pandya, P. G. Sullivan, E. J. Shin, H. C. Kim, D. M. Gash, G. Bing (2009). "Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats." *PLoS One* **4**(5): e5482.
- Choi, I., B. Kim, J. W. Byun, S. H. Baik, Y. H. Huh, J. H. Kim, I. Mook-Jung, W. K. Song, J. H. Shin, H. Seo, Y. H. Suh, I. Jou, S. M. Park, H. C. Kang, E. H. Joe (2015). "LRRK2 G2019S mutation attenuates microglial motility by inhibiting focal adhesion kinase." *Nat Commun* **6**: 8255.
- Chou, J. S., C. Y. Chen, Y. L. Chen, Y. H. Weng, T. H. Yeh, C. S. Lu, Y. M. Chang, H. L. Wang (2014). "(G2019S) LRRK2 causes early-phase dysfunction of SNpc dopaminergic neurons and impairment of corticostriatal long-term depression in the PD transgenic mouse." *Neurobiol Dis* **68**: 190-199.
- Christensen, R., P. K. Kristensen, E. M. Bartels, H. Bliddal, A. Astrup (2007). "Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials." *Lancet* **370**(9600): 1706-1713.
- Chung, S., N. I. Bohnen, R. L. Albin, K. A. Frey, M. L. Muller, R. D. Chervin (2013). "Insomnia and sleepiness in Parkinson disease: associations with symptoms and comorbidities." *J Clin Sleep Med* **9**(11): 1131-1137.
- Churi, S. B., O. S. Abdel-Aleem, K. K. Tumber, H. Scuderi-Porter, B. K. Taylor (2008). "Intrathecal rosiglitazone acts at peroxisome proliferator-activated receptor-gamma to rapidly inhibit neuropathic pain in rats." *J Pain* **9**(7): 639-649.

D'Ambra, T. E., K. G. Estep, M. R. Bell, M. A. Eissenstat, K. A. Josef, S. J. Ward, D. A. Haycock, E. R. Baizman, F. M. Casiano, N. C. Beglin , et al. (1992). "Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor." J Med Chem **35**(1): 124-135.

D'Amelio, M., P. Ragonese, L. Morgante, A. Reggio, G. Callari, G. Salemi , G. Savettieri (2006). "Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study." J Neurol **253**(1): 33-37.

d'Anglemont de Tassigny, X., A. Pascual , J. López-Barneo (2015). "GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease." Front Neuroanat **9**: 10.

Dainese, E., S. Oddi, M. Bari , M. Maccarrone (2007). "Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts." Curr Med Chem **14**(25): 2702-2715.

Darmopil, S., A. B. Martín, I. R. De Diego, S. Ares , R. Moratalla (2009). "Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation." Biol Psychiatry **66**(6): 603-613.

Dasgupta, S., L. M. Castro, R. Dulman, C. Yang, M. Schmidt, E. S. Ferro , L. D. Fricker (2014). "Proteasome inhibitors alter levels of intracellular peptides in HEK293T and SH-SY5Y cells." PLoS One **9**(7): e103604.

Dauer, W. , S. Przedborski (2003). "Parkinson's disease: mechanisms and models." Neuron **39**(6): 889-909.

Dawson, T. M., H. S. Ko , V. L. Dawson (2010). "Genetic animal models of Parkinson's disease." Neuron **66**(5): 646-661.

Dazzi, L., G. Talani, F. Biggio, C. Utzeri, V. Lallai, V. Licheri, S. Lutz, M. C. Mostallino, P. P. Secci, G. Biggio , E. Sanna (2014). "Involvement of the cannabinoid CB1 receptor in modulation of dopamine output in the prefrontal cortex associated with food restriction in rats." PLoS One **9**(3): e92224.

De Deurwaerdere, P., G. Di Giovanni , M. J. Millan (2016). "Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry." Prog Neurobiol.

De Lella Ezcurra, A. L., M. Chertoff, C. Ferrari, M. Graciarena , F. Pitossi (2010). "Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor-alpha in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation." Neurobiol Dis **37**(3): 630-640.

de Mello Schier, A. R., N. P. de Oliveira Ribeiro, D. S. Coutinho, S. Machado, O. Arias-Carrion, J. A. Crippa, A. W. Zuardi, A. E. Nardi , A. C. Silva (2014). "Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of Cannabis sativa." CNS Neurol Disord Drug Targets **13**(6): 953-960.

De Petrocellis, L., T. Bisogno, J. B. Davis, R. G. Pertwee , V. Di Marzo (2000). "Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity." FEBS Lett **483**(1): 52-56.

De Petrocellis, L., A. Ligresti, A. S. Moriello, M. Allara, T. Bisogno, S. Petrosino, C. G. Stott , V. Di Marzo (2011). "Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes." Br J Pharmacol **163**(7): 1479-1494.

De Petrocellis, L., P. Marini, I. Matias, A. S. Moriello, K. Starowicz, L. Cristino, S. Nigam , V. Di Marzo (2007). "Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells." Exp Cell Res **313**(14): 2993-3004.

Del Bel, E. A., A. S. Souza, F. S. Guimaraes, C. A. da-Silva , L. P. Nucci-da-Silva (2002). "Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice." Psychopharmacology (Berl) **161**(1): 32-37.

- Demuth, D. G. , A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." Life Sci **78**(6): 549-563.
- Derkinderen, P., M. Toutant, F. Burgaya, M. Le Bert, J. C. Siciliano, V. de Franciscis, M. Gelman , J. A. Girault (1996). "Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide." Science **273**(5282): 1719-1722.
- Derocq, J. M., M. Segui, J. Marchand, G. Le Fur , P. Casellas (1995). "Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations." FEBS Lett **369**(2-3): 177-182.
- Devane, W. A., F. A. Dysarz, 3rd, M. R. Johnson, L. S. Melvin , A. C. Howlett (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." Mol Pharmacol **34**(5): 605-613.
- Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger , R. Mechoulam (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.
- Dewey, W. L. (1986). "Cannabinoid pharmacology." Pharmacol Rev **38**(2): 151-178.
- Dexter, D. T., A. Carayon, F. Javoy-Agid, Y. Agid, F. R. Wells, S. E. Daniel, A. J. Lees, P. Jenner , C. D. Marsden (1991). "Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia." Brain **114** (Pt 4): 1953-1975.
- Dexter, D. T., A. E. Holley, W. D. Flitter, T. F. Slater, F. R. Wells, S. E. Daniel, A. J. Lees, P. Jenner , C. D. Marsden (1994). "Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study." Mov Disord **9**(1): 92-97.
- Dexter, D. T. , P. Jenner (2013). "Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms." Free Radic Biol Med **62**: 132-144.
- Di Marzo, V. (2008). "Endocannabinoids: synthesis and degradation." Rev Physiol Biochem Pharmacol **160**: 1-24.
- Di Marzo, V. (2011). "Endocannabinoid signaling in the brain: biosynthetic mechanisms in the limelight." Nat Neurosci **14**(1): 9-15.
- Di Marzo, V., T. Bisogno, D. Melck, R. Ross, H. Brockie, L. Stevenson, R. Pertwee , L. De Petrocellis (1998). "Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system." FEBS Lett **436**(3): 449-454.
- Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J. C. Schwartz , D. Piomelli (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." Nature **372**(6507): 686-691.
- Di Marzo, V., S. K. Goparaju, L. Wang, J. Liu, S. Batkai, Z. Jarai, F. Fezza, G. I. Miura, R. D. Palmiter, T. Sugiura, G. Kunos (2001). "Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake." Nature **410**(6830): 822-825.
- Di Marzo, V., M. P. Hill, T. Bisogno, A. R. Crossman , J. M. Brotchie (2000). "Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease." FASEB J **14**(10): 1432-1438.
- Diana, M. A., C. Levenes, K. Mackie , A. Marty (2002). "Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids." J Neurosci **22**(1): 200-208.
- Díaz-Alonso, J., T. Aguado, C. S. Wu, J. Palazuelos, C. Hofmann, P. Garcez, F. Guillemot, H. C. Lu, B. Lutz, M. Guzmán , I. Galve-Roperh (2012). "The CB(1) cannabinoid receptor drives corticospinal motor neuron differentiation through the Ctip2/Satb2 transcriptional regulation axis." J Neurosci **32**(47): 16651-16665.

Díaz-Alonso, J., J. Paraíso-Luna, C. Navarrete, C. Del Río, I. Cantarero, B. Palomares, J. Agüeroles, J. Fernández-Ruiz, M. L. Bellido, F. Pollastro, G. Appendino, M. A. Calzado, I. Galve-Roperh, E. Muñoz (2016). "VCE-003.2, a novel cannabigerol derivative, enhances neuronal progenitor cell survival and alleviates symptomatology in murine models of Huntington's disease." Sci Rep **6**: 29789.

Dimitrijevic, M. R., S. M. Danner, W. Mayr (2015). "Neurocontrol of Movement in Humans With Spinal Cord Injury." Artif Organs **39**(10): 823-833.

Ding, Y., J. Restrepo, L. Won, D. Y. Hwang, K. S. Kim, U. J. Kang (2007). "Chronic 3,4-dihydroxyphenylalanine treatment induces dyskinesia in aphakia mice, a novel genetic model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **27**(1): 11-23.

Ding, Y., L. Won, J. P. Britt, S. A. Lim, D. S. McGehee, U. J. Kang (2011). "Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(2): 840-845.

Dinh, T. P., D. Carpenter, F. M. Leslie, T. F. Freund, I. Katona, S. L. Sensi, S. Kathuria, D. Piomelli (2002). "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10819-10824.

Dinh, T. P., T. F. Freund, D. Piomelli (2002). "A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 149-158.

Dong, X. X., Y. Wang, Z. H. Qin (2009). "Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases." Acta Pharmacol Sin **30**(4): 379-387.

Drechsel, D. A., A. G. Estevez, L. Barbeito, J. S. Beckman (2012). "Nitric oxide-mediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS." Neurotox Res **22**(4): 251-264.

Duarte, J. M., S. G. Ferreira, R. A. Carvalho, R. A. Cunha, A. Kofalvi (2012). "CB(1) receptor activation inhibits neuronal and astrocytic intermediary metabolism in the rat hippocampus." Neurochem Int **60**(1): 1-8.

Ehringer, H., O. Hornykiewicz (1960). "[Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]." Klin Wochenschr **38**: 1236-1239.

El Manira, A., A. Kyriakatos (2010). "The role of endocannabinoid signaling in motor control." Physiology (Bethesda) **25**(4): 230-238.

Esmaeili, M. H., Z. Reisi, S. Ezzatpanah, A. Haghparast (2016). "Functional interaction between orexin-1 and CB1 receptors in the periaqueductal gray matter during antinociception induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus in rats." Eur J Pain.

Espejo-Porras, F., J. Fernández-Ruiz, R. G. Pertwee, R. Mechoulam, C. García (2013). "Motor effects of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol that are mediated by 5-HT1A receptors." Neuropharmacology **75**: 155-163.

Esposito, G., D. De Filippis, M. C. Maiuri, D. De Stefano, R. Carnuccio, T. Iuvone (2006). "Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement." Neurosci Lett **399**(1-2): 91-95.

Esposito, G., C. Scuderi, M. Valenza, G. I. Togni, V. Latina, D. De Filippis, M. Cipriano, M. R. Carratu, T. Iuvone, L. Steardo (2011). "Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement." PLoS One **6**(12): e28668.

Fabbrini, G., J. M. Brotchie, F. Grandas, M. Nomoto, C. G. Goetz (2007). "Levodopa-induced dyskinesias." Mov Disord **22**(10): 1379-1389; quiz 1523.

- Fagan, S. G. , V. A. Campbell (2014). "The influence of cannabinoids on generic traits of neurodegeneration." Br J Pharmacol **171**(6): 1347-1360.
- Felder, C. C. , M. Glass (1998). "Cannabinoid receptors and their endogenous agonists." Annu Rev Pharmacol Toxicol **38**: 179-200.
- Felder, C. C., K. E. Joyce, E. M. Briley, J. Mansouri, K. Mackie, O. Blond, Y. Lai, A. L. Ma , R. L. Mitchell (1995). "Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Mol Pharmacol **48**(3): 443-450.
- Felder, C. C., A. Nielsen, E. M. Briley, M. Palkovits, J. Priller, J. Axelrod, D. N. Nguyen, J. M. Richardson, R. M. Riggan, G. A. Koppel, S. M. Paul , G. W. Becker (1996). "Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat." FEBS Lett **393**(2-3): 231-235.
- Fernández-Espejo, E., I. Caraballo, F. R. de Fonseca, F. El Banoua, B. Ferrer, J. A. Flores , B. Galan-Rodriguez (2005). "Cannabinoid CB1 antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism." Neurobiol Dis **18**(3): 591-601.
- Fernández-Ruiz, J. (2009). "The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction." Br J Pharmacol **156**(7): 1029-1040.
- Fernández-Ruiz, J., C. García, O. Sagredo, M. Gómez-Ruiz , E. de Lago (2010). "The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage." Expert Opin Ther Targets **14**(4): 387-404.
- Fernández-Ruiz, J. , S. González (2005). "Cannabinoid control of motor function at the basal ganglia." Handb Exp Pharmacol(168): 479-507.
- Fernández-Ruiz, J., M. Hernández , J. A. Ramos (2010). "Cannabinoid-dopamine interaction in the pathophysiology and treatment of CNS disorders." CNS Neurosci Ther **16**(3): e72-91.
- Fernández-Ruiz, J., M. Moreno-Martet, C. Rodríguez-Cueto, C. Palomo-Garo, M. Gómez-Cañas, S. Valdeolivas, C. Guaza, J. Romero, M. Guzmán, R. Mechoulam , J. A. Ramos (2011). "Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders." Br J Pharmacol **163**(7): 1365-1378.
- Fernández-Ruiz, J., M. A. Moro , J. Martínez-Orgado (2015). "Cannabinoids in Neurodegenerative Disorders and Stroke/Brain Trauma: From Preclinical Models to Clinical Applications." Neurotherapeutics **12**(4): 793-806.
- Fernández-Ruiz, J., J. Romero , J. A. Ramos (2015). "Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others." Handb Exp Pharmacol **231**: 233-259.
- Fernández-Ruiz, J., J. Romero, G. Velasco, R. M. Tolon, J. A. Ramos , M. Guzman (2007). "Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?" Trends Pharmacol Sci **28**(1): 39-45.
- Fernandez-Ruiz, J., O. Sagredo, M. R. Pazos, C. Garcia, R. Pertwee, R. Mechoulam , J. Martinez-Orgado (2013). "Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid?" Br J Clin Pharmacol **75**(2): 323-333.
- Fernández-Ruiz, J., O. Sagredo, M. R. Pazos, C. García, R. Pertwee, R. Mechoulam , J. Martínez-Orgado (2013). "Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid?" Br J Clin Pharmacol **75**(2): 323-333.
- Ferre, P. (2004). "The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity." Diabetes **53 Suppl 1**: S43-50.
- Ferré, S., S. R. Goldberg, C. Lluís , R. Franco (2009). "Looking for the role of cannabinoid receptor heteromers in striatal function." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 226-234.

Ferrer, B., N. Asbrock, S. Kathuria, D. Piomelli, A. Giuffrida (2003). "Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias." Eur J Neurosci **18**(6): 1607-1614.

Ferry, A., P. Joanne, W. Hadj-Said, A. Vignaud, A. Lilienbaum, C. Hourde, F. Medja, P. Noirez, F. Charbonnier, A. Chatonnet, F. Chevessier, S. Nicole, O. Agbulut, G. Butler-Browne (2014). "Advances in the understanding of skeletal muscle weakness in murine models of diseases affecting nerve-evoked muscle activity, motor neurons, synapses and myofibers." Neuromuscul Disord **24**(11): 960-972.

Fezza, F., T. Bisogno, A. Minassi, G. Appendino, R. Mechoulam, V. Di Marzo (2002). "Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues." FEBS Lett **513**(2-3): 294-298.

Fezza, F., M. Maccarrone (2014). Endocannabinoid biochemistry: What do we know after 50 years? Cannabinoids, John Wiley & Sons, Ltd: 53-94.

Fidaleo, M., F. Fanelli, M. P. Ceru, S. Moreno (2014). "Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and its lipid ligands." Curr Med Chem **21**(24): 2803-2821.

Fimiani, C., T. Liberty, A. J. Aquirre, I. Amin, N. Ali, G. B. Stefano (1999). "Opiate, cannabinoid, and eicosanoid signaling converges on common intracellular pathways nitric oxide coupling." Prostaglandins Other Lipid Mediat **57**(1): 23-34.

Fisar, Z. (2009). "Phytocannabinoids and endocannabinoids." Curr Drug Abuse Rev **2**(1): 51-75.

Forno, L. S., J. W. Langston, L. E. DeLanney, I. Irwin, G. A. Ricaurte (1986). "Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys." Ann Neurol **20**(4): 449-455.

Fouda, H. G., J. Lukaszewicz, E. W. Luther (1987). "Selected ion monitoring analysis of CP-55,940, a cannabinoid derived analgetic agent." Biomed Environ Mass Spectrom **14**(11): 599-602.

Fowler, C. J., G. Tiger, M. L. Lopez-Rodriguez, A. Viso, S. Ortega-Gutierrez, J. A. Ramos (2003). "Inhibition of fatty acid amidohydrolase, the enzyme responsible for the metabolism of the endocannabinoid anandamide, by analogues of arachidonoyl-serotonin." J Enzyme Inhib Med Chem **18**(3): 225-231.

Frankel, J. P., A. Hughes, A. J. Lees, G. M. Stern (1990). "Marijuana for parkinsonian tremor." J Neurol Neurosurg Psychiatry **53**(5): 436.

Freund, T. F., I. Katona, D. Piomelli (2003). "Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling." Physiol Rev **83**(3): 1017-1066.

Fu, J., G. Bottegoni, O. Sasso, R. Bertorelli, W. Rocchia, M. Masetti, A. Guijarro, A. Lodola, A. Armirotti, G. Garau, T. Bandiera, A. Reggiani, M. Mor, A. Cavalli, D. Piomelli (2012). "A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons." Nat Neurosci **15**(1): 64-69.

Fu, J., S. Gaetani, F. Oveisi, J. Lo Verme, A. Serrano, F. Rodriguez De Fonseca, A. Rosengarth, H. Luecke, B. Di Giacomo, G. Tarzia, D. Piomelli (2003). "Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha." Nature **425**(6953): 90-93.

Fuchs, J., J. C. Mueller, P. Lichtner, C. Schulte, M. Munz, D. Berg, U. Wullner, T. Illig, M. Sharma, T. Gasser (2009). "The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **30**(5): 731-738.

Fuenzalida, K., R. Quintanilla, P. Ramos, D. Piderit, R. A. Fuentealba, G. Martinez, N. C. Inestrosa, M. Bronfman (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma up-regulates the Bcl-2 anti-apoptotic protein in neurons and induces mitochondrial stabilization and protection against oxidative stress and apoptosis." J Biol Chem **282**(51): 37006-37015.

Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, P. Casellas (1995). "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." Eur J Biochem **232**(1): 54-61.

Galter, D., K. Pernold, T. Yoshitake, E. Lindqvist, B. Hoffer, J. Kehr, N. G. Larsson, L. Olson (2010). "MitoPark mice mirror the slow progression of key symptoms and L-DOPA response in Parkinson's disease." Genes Brain Behav **9**(2): 173-181.

Galve-Roperh, I., T. Aguado, J. Palazuelos, M. Guzman (2008). "Mechanisms of control of neuron survival by the endocannabinoid system." Curr Pharm Des **14**(23): 2279-2288.

García-Arencibia, M., L. Ferraro, S. Tanganelli, J. Fernandez-Ruiz (2008). "Enhanced striatal glutamate release after the administration of rimonabant to 6-hydroxydopamine-lesioned rats." Neurosci Lett **438**(1): 10-13.

García-Arencibia, M., C. García, J. Fernández-Ruiz (2009). "Cannabinoids and Parkinson's disease." CNS Neurol Disord Drug Targets **8**(6): 432-439.

García-Arencibia, M., C. García, J. Fernández-Ruiz (2009). "Cannabinoids and Parkinson's disease." CNS Neurol Disord Drug Targets **8**(6): 432-439.

García-Arencibia, M., C. García, A. Kurz, J. A. Rodríguez-Navarro, S. Gispert-Sachez, M. A. Mena, G. Auburger, J. G. de Yébenes, J. Fernández-Ruiz (2009). "Cannabinoid CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes." J Neural Transm Suppl(73): 269-275.

García-Arencibia, M., S. González, E. de Lago, J. A. Ramos, R. Mechoulam, J. Fernández-Ruiz (2007). "Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties." Brain Res **1134**(1): 162-170.

García-Miralles, M., J. Coomaraswamy, K. Habig, M. C. Herzig, N. Funk, F. Gillardon, M. Maisel, M. Jucker, T. Gasser, D. Galter, S. Biskup (2015). "No dopamine cell loss or changes in cytoskeleton function in transgenic mice expressing physiological levels of wild type or G2019S mutant LRRK2 and in human fibroblasts." PLoS One **10**(4): e0118947.

García, C., C. Palomo-Garo, Y. Gómez-Galvez, J. Fernández-Ruiz (2015). "Cannabinoid-dopamine interactions in the physiology and physiopathology of the basal ganglia." Br J Pharmacol.

Gasperi, V., E. Dainese, S. Oddi, A. Sabatucci, M. Maccarrone (2013). "GPR55 and its interaction with membrane lipids: comparison with other endocannabinoid-binding receptors." Curr Med Chem **20**(1): 64-78.

Gatley, S. J., A. N. Gifford, N. D. Volkow, R. Lan, A. Makriyannis (1996). "123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors." Eur J Pharmacol **307**(3): 331-338.

Gatley, S. J., R. Lan, N. D. Volkow, N. Pappas, P. King, C. T. Wong, A. N. Gifford, B. Pyatt, S. L. Dewey, A. Makriyannis (1998). "Imaging the brain marijuana receptor: development of a radioligand that binds to cannabinoid CB1 receptors in vivo." J Neurochem **70**(1): 417-423.

Georgopoulos, A. P., A. F. Carpenter (2015). "Coding of movements in the motor cortex." Curr Opin Neurobiol **33**: 34-39.

Gerard, C. M., C. Mollereau, G. Vassart, M. Parmentier (1991). "Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis." Biochem J **279** (Pt 1): 129-134.

Gerdeman, G. L., J. Fernández-Ruiz (2008). The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the basal ganglia. Cannabinoids and the Brain. K. A. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag: 423-483.

Giasson, B. I., J. E. Duda, I. V. Murray, Q. Chen, J. M. Souza, H. I. Hurtig, H. Ischiropoulos, J. Q. Trojanowski, V. M. Lee (2000). "Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions." *Science* **290**(5493): 985-989.

Gilbert, G. L., H. J. Kim, J. J. Waataja, S. A. Thayer (2007). "Delta9-tetrahydrocannabinol protects hippocampal neurons from excitotoxicity." *Brain Res* **1128**(1): 61-69.

Gillardon, F., R. Schmid, H. Draheim (2012). "Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity." *Neuroscience* **208**: 41-48.

Giorgi, M., V. D'Angelo, Z. Esposito, V. Nuccetelli, R. Sorge, A. Martorana, A. Stefani, G. Bernardi, G. Sancesario (2008). "Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms." *Eur J Neurosci* **28**(5): 941-950.

Giuffrida, A., D. Piomelli (2000). "The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control." *Chem Phys Lipids* **108**(1-2): 151-158.

Glaser, S. T., N. A. Abumrad, F. Fatade, M. Kaczocha, K. M. Studholme, D. G. Deutsch (2003). "Evidence against the presence of an anandamide transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 4269-4274.

Glass, M., C. C. Felder (1997). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor." *J Neurosci* **17**(14): 5327-5333.

Goldman, J. E., S. H. Yen, F. C. Chiu, N. S. Peress (1983). "Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens." *Science* **221**(4615): 1082-1084.

Gomez-Galvez, Y., C. Palomo-Garo, J. Fernandez-Ruiz, C. Garcia (2016). "Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **64**: 200-208.

Gómez Del Pulgar, T., M. L. De Ceballos, M. Guzman, G. Velasco (2002). "Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway." *J Biol Chem* **277**(39): 36527-36533.

Gong, J. P., E. S. Onaivi, H. Ishiguro, Q. R. Liu, P. A. Tagliaferro, A. Brusco, G. R. Uhl (2006). "Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain." *Brain Res* **1071**(1): 10-23.

Gonsiorek, W., C. Lunn, X. Fan, S. Narula, D. Lundell, R. W. Hipkin (2000). "Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide." *Mol Pharmacol* **57**(5): 1045-1050.

González-Aparicio, R., R. Moratalla (2014). "Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease." *Neurobiol Dis* **62**: 416-425.

González, S., M. A. Mena, I. Lastres-Becker, A. Serrano, J. G. de Yébenes, J. A. Ramos, J. Fernández-Ruiz (2005). "Cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia and motor response to activation or blockade of these receptors in parkin-null mice." *Brain Res* **1046**(1-2): 195-206.

González, S., C. Scorticati, M. García-Arencibia, R. de Miguel, J. A. Ramos, J. Fernández-Ruiz (2006). "Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease." *Brain Res* **1073-1074**: 209-219.

Goparaju, S. K., N. Ueda, H. Yamaguchi, S. Yamamoto (1998). "Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand." *FEBS Lett* **422**(1): 69-73.

Gould, J. (2015). "The cannabis crop." *Nature* **525**(7570): S2-3.

Gould, T. D., D. T. Dao , C. E. Kovacsics (2009). The Open Field Test. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests. D. T. Gould. Totowa, NJ, Humana Press: 1-20.

Gowran, A., J. Noonan , V. A. Campbell (2011). "The multiplicity of action of cannabinoids: implications for treating neurodegeneration." CNS Neurosci Ther **17**(6): 637-644.

Graham, D. G. (1979). "On the origin and significance of neuromelanin." Arch Pathol Lab Med **103**(7): 359-362.

Granja, A. G., F. Carrillo-Salinas, A. Pagani, M. Gómez-Cañas, R. Negri, C. Navarrete, M. Mecha, L. Mestre, B. L. Fiebich, I. Cantarero, M. A. Calzado, M. L. Bellido, J. Fernández-Ruiz, G. Appendino, C. Guaza , E. Muñoz (2012). "A cannabigerol quinone alleviates neuroinflammation in a chronic model of multiple sclerosis." J Neuroimmune Pharmacol **7**(4): 1002-1016.

Greggio, E., L. Civiero, M. Bisaglia , L. Bubacco (2012). "Parkinson's disease and immune system: is the culprit LRRKing in the periphery?" Journal of neuroinflammation **9**(1): 1.

Griffin, G., S. R. Fernando, R. A. Ross, N. G. McKay, M. L. Ashford, D. Shire, J. W. Huffman, S. Yu, J. A. Lainton, R. G. Pertwee (1997). "Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals." Eur J Pharmacol **339**(1): 53-61.

Grimaldi, P., P. Orlando, S. Di Siena, F. Lolicato, S. Petrosino, T. Bisogno, R. Geremia, L. De Petrocellis , V. Di Marzo (2009). "The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(27): 11131-11136.

Grunblatt, E., S. Zehetmayer, C. P. Jacob, T. Muller, W. H. Jost , P. Riederer (2010). "Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease." J Neural Transm (Vienna) **117**(12): 1387-1393.

Gu, M., A. D. Owen, S. E. Toffa, J. M. Cooper, D. T. Dexter, P. Jenner, C. D. Marsden , A. H. Schapira (1998). "Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases." J Neurol Sci **158**(1): 24-29.

Gubellini, P., B. Picconi, M. Bari, N. Battista, P. Calabresi, D. Centonze, G. Bernardi, A. Finazzi-Agro , M. Maccarrone (2002). "Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission." J Neurosci **22**(16): 6900-6907.

Guindon, J. , A. G. Hohmann (2008). "Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain." Br J Pharmacol **153**(2): 319-334.

Guindon, J. , A. G. Hohmann (2008). "A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism." Br J Pharmacol **153**(7): 1341-1343.

Guo, J., D. J. Williams , S. R. Ikeda (2008). "N-arachidonoyl L-serine, a putative endocannabinoid, alters the activation of N-type Ca²⁺ channels in sympathetic neurons." J Neurophysiol **100**(2): 1147-1151.

Gutiérrez-Valdez, A. L., R. García-Ruiz, V. Anaya-Martínez, C. Torres-Esquivel, J. Espinosa-Villanueva, L. Reynoso-Erazo, R. Tron-Alvarez, P. Aley-Medina, J. Sánchez-Betancourt, E. Montiel-Flores , M. R. Avila-Costa (2013). "The combination of oral L-DOPA/rimonabant for effective dyskinesia treatment and cytological preservation in a rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia." Behav Pharmacol **24**(8): 640-652.

Guzmán, M. (2003). "Cannabinoids: potential anticancer agents." Nat Rev Cancer **3**(10): 745-755.

Guzmán, M., J. Lo Verme, J. Fu, F. Oveisi, C. Blázquez , D. Piomelli (2004). "Oleylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha)." J Biol Chem **279**(27): 27849-27854.

Guzmán, M., C. Sánchez , I. Galve-Roperh (2001). "Control of the cell survival/death decision by cannabinoids." J Mol Med (Berl) **78**(11): 613-625.

Hallett, P. J., O. Cooper, D. Sadi, H. Robertson, I. Mendez , O. Isacson (2014). "Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson's Disease Patients." Cell Reports **7**(6): 1755-1761.

Hansen, K. B., M. M. Rosenkilde, F. K. Knop, N. Wellner, T. A. Diep, J. F. Rehfeld, U. B. Andersen, J. J. Holst, H. S. Hansen (2011). "2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans." J Clin Endocrinol Metab **96**(9): E1409-1417.

Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D. E. Shalev, I. Kustanovich , R. Mechoulam (2001). "2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(7): 3662-3665.

Hanus, L., Y. Avraham, D. Ben-Shushan, O. Zolotarev, E. M. Berry , R. Mechoulam (2003). "Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain." Brain Res **983**(1-2): 144-151.

Hanus, L., A. Breuer, S. Tchilibon, S. Shiloah, D. Goldenberg, M. Horowitz, R. G. Pertwee, R. A. Ross, R. Mechoulam , E. Fride (1999). "HU-308: a specific agonist for CB(2), a peripheral cannabinoid receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14228-14233.

Hardy, J., P. Lewis, T. Revesz, A. Lees , C. Paisan-Ruiz (2009). "The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review." Curr Opin Genet Dev **19**(3): 254-265.

Haycock, D. A., J. E. Kuster, J. I. Stevenson, S. J. Ward , T. D'Ambra (1990). "Characterization of aminoalkylindole binding: selective displacement by cannabinoids." NIDA Res Monogr **105**: 304-305.

Heifets, B. D., V. Chevalleyre , P. E. Castillo (2008). "Interneuron activity controls endocannabinoid-mediated presynaptic plasticity through calcineurin." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10250-10255.

Henderson, B. T., C. G. Clough, R. C. Hughes, E. R. Hitchcock , B. G. Kenny (1991). "Implantation of human fetal ventral mesencephalon to the right caudate nucleus in advanced Parkinson's disease." Arch Neurol **48**(8): 822-827.

Herman, T. S., S. E. Jones, J. Dean, S. Leigh, R. Dorr, T. E. Moon , S. E. Salmon (1977). "Nabilone: a potent antiemetic cannabinol with minimal euphoria." Biomedicine **27**(9-10): 331-334.

Hernández-Romero, M. C., M. J. Delgado-Cortes, M. Sarmiento, R. M. de Pablos, A. M. Espinosa-Oliva, S. Argüelles, M. J. Bandez, R. F. Villaran, R. Maurino, M. Santiago, J. L. Venero, A. J. Herrera, J. Cano , A. Machado (2012). "Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system." Neurotoxicology **33**(3): 347-360.

Herrera, A. J., A. Castaño, J. L. Venero, J. Cano , A. Machado (2000). "The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system." Neurobiol Dis **7**(4): 429-447.

Herrera, B., A. Carracedo, M. Diez-Zaera, M. Guzmán , G. Velasco (2005). "p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells." FEBS Lett **579**(22): 5084-5088.

Herring, A. C., W. S. Koh , N. E. Kaminski (1998). "Inhibition of the cyclic AMP signaling cascade and nuclear factor binding to CRE and kappaB elements by cannabinol, a minimally CNS-active cannabinoid." Biochem Pharmacol **55**(7): 1013-1023.

Hiebel, C. , C. Behl (2015). "The complex modulation of lysosomal degradation pathways by cannabinoid receptors 1 and 2." Life Sci **138**: 3-7.

Hikosaka, O. , M. Isoda (2010). "Switching from automatic to controlled behavior: cortico-basal ganglia mechanisms." Trends Cogn Sci **14**(4): 154-161.

Hildebrandt, A. L., D. M. Kelly-Sullivan , S. C. Black (2003). "Antiobesity effects of chronic cannabinoid CB1 receptor antagonist treatment in diet-induced obese mice." Eur J Pharmacol **462**(1-3): 125-132.

- Hillard, C. J., W. S. Edgemond, A. Jarrahan , W. B. Campbell (1997). "Accumulation of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion." J Neurochem **69**(2): 631-638.
- Hillard, C. J., S. Manna, M. J. Greenberg, R. DiCamelli, R. A. Ross, L. A. Stevenson, V. Murphy, R. G. Pertwee, W. B. Campbell (1999). "Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1)." J Pharmacol Exp Ther **289**(3): 1427-1433.
- Hillig, K. W. (2005). "Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae)." Genetic Resources and Crop Evolution **52**(2): 161-180.
- Hillig, K. W. , P. G. Mahlberg (2004). "A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae)." Am J Bot **91**(6): 966-975.
- Hirsch, E. C., T. Breidert, E. Rousset, S. Hunot, A. Hartmann , P. P. Michel (2003). "The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **991**: 214-228.
- Hirsch, E. C. , S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.
- Hisano, S., H. Haga, K. Miyamoto, E. Takeda , Y. Fukui (1996). "The basic amino acid transporter (rBAT)-like immunoreactivity in paraventricular and supraoptic magnocellular neurons of the rat hypothalamus." Brain Res **710**(1-2): 299-302.
- Hisata, J. (2002). Final supplemental environmental impact statement. Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks Washington Department of Fish and Wildlife.
- Hockey, L. N., B. S. Kilpatrick, E. R. Eden, Y. Lin-Moshier, G. C. Brailoiu, E. Brailoiu, C. E. Futter, A. H. Schapira, J. S. Marchant , S. Patel (2015). "Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition." J Cell Sci **128**(2): 232-238.
- Hoffman, A. F. , C. R. Lupica (2000). "Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus." J Neurosci **20**(7): 2470-2479.
- Hollister, L. E. (1986). "Health aspects of cannabis." Pharmacol Rev **38**(1): 1-20.
- Hornby, P. J. (2001). "Central neurocircuitry associated with emesis." Am J Med **111 Suppl 8A**: 106S-112S.
- Hornykiewicz, O. , S. J. Kish (1987). "Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease." Adv Neurol **45**: 19-34.
- Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam , R. G. Pertwee (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.
- Howlett, A. C., T. M. Champion, G. H. Wilken , R. Mechoulam (1990). "Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor." Neuropharmacology **29**(2): 161-165.
- Howlett, A. C., M. R. Johnson, L. S. Melvin , G. M. Milne (1988). "Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model." Mol Pharmacol **33**(3): 297-302.
- Howlett, A. C. , S. Mukhopadhyay (2000). "Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol." Chem Phys Lipids **108**(1-2): 53-70.
- Howlett, T. A., G. M. Besser , L. H. Rees (1988). "Characterization of immunoreactive dynorphin in human pheochromocytomas." J Endocrinol **117**(1): 123-132.
- Hsu, K. L., K. Tsuboi, J. W. Chang, L. R. Whitby, A. E. Speers, H. Pugh , B. F. Cravatt (2013). "Discovery and optimization of piperidyl-1,2,3-triazole ureas as potent, selective, and in vivo-active inhibitors of alpha/beta-hydrolase domain containing 6 (ABHD6)." J Med Chem **56**(21): 8270-8279.

Huang, S. M., T. Bisogno, M. Trevisani, A. Al-Hayani, L. De Petrocellis, F. Fezza, M. Tognetto, T. J. Petros, J. F. Krey, C. J. Chu, J. D. Miller, S. N. Davies, P. Geppetti, J. M. Walker, V. Di Marzo (2002). "An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8400-8405.

Hubsher, G., M. Haider, M. S. Okun (2012). "Amantadine: the journey from fighting flu to treating Parkinson disease." Neurology **78**(14): 1096-1099.

Huffman, J. W. (2000). "The search for selective ligands for the CB2 receptor." Curr Pharm Des **6**(13): 1323-1337.

Hunter, R. L., B. Cheng, D. Y. Choi, M. Liu, S. Liu, W. A. Cass, G. Bing (2009). "Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice." J Neurosci Res **87**(8): 1913-1921.

Huot, P., T. H. Johnston, J. B. Koprich, S. H. Fox, J. M. Brotchie (2013). "The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease." Pharmacol Rev **65**(1): 171-222.

Hurley, M. J., D. C. Mash, P. Jenner (2003). "Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain." J Neural Transm (Vienna) **110**(11): 1279-1288.

Hwang, D. Y., P. Ardayfio, U. J. Kang, E. V. Semina, K. S. Kim (2003). "Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice." Brain Res Mol Brain Res **114**(2): 123-131.

Iannotti, F. A., C. L. Hill, A. Leo, A. Alhusaini, C. Soubrane, E. Mazzearella, E. Russo, B. J. Whalley, V. Di Marzo, G. J. Stephens (2014). "Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability." ACS Chem Neurosci **5**(11): 1131-1141.

International Parkinson Disease Genomics Consortium, M. A. Nalls, V. Plagnol, D. G. Hernandez, M. Sharma, U. M. Sheerin, M. Saad, J. Simon-Sanchez, C. Schulte, S. Lesage, S. Sveinbjornsdottir, K. Stefansson, M. Martinez, J. Hardy, P. Heutink, A. Brice, T. Gasser, A. B. Singleton, N. W. Wood (2011). "Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies." Lancet **377**(9766): 641-649.

Iravani, M. M., C. C. Leung, M. Sadeghian, C. O. Haddon, S. Rose, P. Jenner (2005). "The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation." Eur J Neurosci **22**(2): 317-330.

Izzo, A. A., F. Borrelli, R. Capasso, V. Di Marzo, R. Mechoulam (2009). "Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb." Trends Pharmacol Sci **30**(10): 515-527.

Izzo, A. A., R. Capasso, G. Aviello, F. Borrelli, B. Romano, F. Piscitelli, L. Gallo, F. Capasso, P. Orlando, V. Di Marzo (2012). "Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychotropic cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced hypermotility in mice." Br J Pharmacol **166**(4): 1444-1460.

Jamshidi, N., D. A. Taylor (2001). "Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats." Br J Pharmacol **134**(6): 1151-1154.

Javed, H., S. Azimullah, M. E. Haque and S. K. Ojha (2016). "Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease." Front Neurosci **10**: 321.

Jiao, S. S., W. C. Zhang, J. K. Cao, Z. M. Zhang, H. Wang, M. C. Ding, Z. Zhang, J. B. Sun, Y. C. Sun, M. T. Shi (1988). "Study of adrenal medullary tissue transplantation to striatum in parkinsonism." Prog Brain Res **78**: 575-580.

Jimenez-Del-Rio, M., A. Daza-Restrepo, C. Velez-Pardo (2008). "The cannabinoid CP55,940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: implications in Parkinson's disease." *Neurosci Res* **61**(4): 404-411.

Jomova, K., D. Vondrakova, M. Lawson, M. Valko (2010). "Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders." *Mol Cell Biochem* **345**(1-2): 91-104.

Jonsson, G. (1980). "Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology." *Annu Rev Neurosci* **3**: 169-187.

Jordt, S. E., D. M. Bautista, H. H. Chuang, D. D. McKemy, P. M. Zygmunt, E. D. Hogestatt, I. D. Meng, D. Julius (2004). "Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1." *Nature* **427**(6971): 260-265.

Joyeux, M., C. Arnaud, D. Godin-Ribuot, P. Demenge, D. Lamontagne, C. Ribuot (2002). "Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts." *Cardiovasc Res* **55**(3): 619-625.

Juknat, A., M. Pietr, E. Kozela, N. Rimmerman, R. Levy, G. Coppola, D. Geschwind, Z. Vogel (2012). "Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Delta9-tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells." *Br J Pharmacol* **165**(8): 2512-2528.

Juknat, A., M. Pietr, E. Kozela, N. Rimmerman, R. Levy, F. Gao, G. Coppola, D. Geschwind, Z. Vogel (2013). "Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells." *PLoS One* **8**(4): e61462.

Julien, B., P. Grenard, F. Teixeira-Clerc, J. T. Van Nhieu, L. Li, M. Karsak, A. Zimmer, A. Mallat, S. Lotersztajn (2005). "Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver." *Gastroenterology* **128**(3): 742-755.

Kaczocha, M., S. T. Glaser, D. G. Deutsch (2009). "Identification of intracellular carriers for the endocannabinoid anandamide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15): 6375-6380.

Kaminski, N. E. (1998). "Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors." *J Neuroimmunol* **83**(1-2): 124-132.

Kano, M., T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, M. Watanabe (2009). "Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission." *Physiol Rev* **89**(1): 309-380.

Kargl, J., N. Balenga, G. P. Parzmair, A. J. Brown, A. Heinemann, M. Waldhoer (2012). "The cannabinoid receptor CB1 modulates the signaling properties of the lysophosphatidylinositol receptor GPR55." *J Biol Chem* **287**(53): 44234-44248.

Karsak, M., M. Cohen-Solal, J. Freudenberger, A. Ostertag, C. Morieux, U. Kornak, J. Essig, E. Erxleben, I. Bab, C. Kubisch, M. C. de Vernejoul, A. Zimmer (2005). "Cannabinoid receptor type 2 gene is associated with human osteoporosis." *Hum Mol Genet* **14**(22): 3389-3396.

Kelsey, J. E., O. Harris, J. Cassin (2009). "The CB(1) antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease." *Behav Brain Res* **203**(2): 304-307.

Khan, N. L., S. Jain, J. M. Lynch, N. Pavese, P. Abou-Sleiman, J. L. Holton, D. G. Healy, W. P. Gilks, M. G. Sweeney, M. Ganguly, V. Gibbons, S. Gandhi, J. Vaughan, L. H. Eunson, R. Katzenschlager, J. Gayton, G. Lennox, T. Revesz, D. Nicholl, K. P. Bhatia, N. Quinn, D. Brooks, A. J. Lees, M. B. Davis, P. Piccini, A. B. Singleton, N. W. Wood (2005). "Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data." *Brain* **128**(Pt 12): 2786-2796.

Khasabova, I. A., J. Gielissen, A. Chandiramani, C. Harding-Rose, D. A. Odeh, D. A. Simone, V. S. Seybold (2011). "CB1 and CB2 receptor agonists promote analgesia through synergy in a murine model of tumor pain." *Behav Pharmacol* **22**(5-6): 607-616.

Khaspekov, L. G., M. S. Brenz Verca, L. E. Frumkina, H. Hermann, G. Marsicano , B. Lutz (2004). "Involvement of brain-derived neurotrophic factor in cannabinoid receptor-dependent protection against excitotoxicity." Eur J Neurosci **19**(7): 1691-1698.

Kikuchi, A., A. Takeda, H. Onodera, T. Kimpara, K. Hisanaga, N. Sato, A. Nunomura, R. J. Castellani, G. Perry, M. A. Smith , Y. Itoyama (2002). "Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy." Neurobiol Dis **9**(2): 244-248.

Kim, S. H., S. J. Won, X. O. Mao, K. Jin , D. A. Greenberg (2006). "Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity." Mol Pharmacol **69**(3): 691-696.

Kirkham, T. C., C. M. Williams, F. Fezza , V. Di Marzo (2002). "Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol." Br J Pharmacol **136**(4): 550-557.

Knott, C., G. Stern , G. P. Wilkin (2000). "Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2." Mol Cell Neurosci **16**(6): 724-739.

Köfalvi, A. (2007). *Cannabinoids and the Brain*, Springer Science & Business Media.

Kondo, S., H. Kondo, S. Nakane, T. Kodaka, A. Tokumura, K. Waku , T. Sugiura (1998). "2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms." FEBS Lett **429**(2): 152-156.

Kozak, K. R., R. A. Gupta, J. S. Moody, C. Ji, W. E. Boeglin, R. N. DuBois, A. R. Brash , L. J. Marnett (2002). "15-Lipoxygenase metabolism of 2-arachidonoylglycerol. Generation of a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist." J Biol Chem **277**(26): 23278-23286.

Kreitzer, A. C. , W. G. Regehr (2001). "Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells." Neuron **29**(3): 717-727.

Kumaran, R. , M. R. Cookson (2015). "Pathways to Parkinsonism Redux: convergent pathobiological mechanisms in genetics of Parkinson's disease." Hum Mol Genet **24**(R1): R32-44.

Kuzuhara, S., H. Mori, N. Izumiyama, M. Yoshimura , Y. Ihara (1988). "Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study." Acta Neuropathol **75**(4): 345-353.

Lambert, D. M. , V. Di Marzo (1999). "The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic?" Curr Med Chem **6**(8): 757-773.

Lanciego, J. L., P. Barroso-Chinea, A. J. Rico, L. Conte-Perales, L. Callen, E. Roda, V. Gomez-Bautista, I. P. Lopez, C. Lluís, J. L. Labandeira-García , R. Franco (2011). "Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*." J Psychopharmacol **25**(1): 97-104.

Langston, J. W., P. Ballard, J. W. Tetrad , I. Irwin (1983). "Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis." Science **219**(4587): 979-980.

Lastres-Becker, I., M. Cebeira, M. L. de Ceballos, B. Y. Zeng, P. Jenner, J. A. Ramos , J. J. Fernández-Ruiz (2001). "Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets." Eur J Neurosci **14**(11): 1827-1832.

Lastres-Becker, I., F. Molina-Holgado, J. A. Ramos, R. Mechoulam , J. Fernández-Ruiz (2005). "Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease." Neurobiol Dis **19**(1-2): 96-107.

Lauckner, J. E., B. Hille , K. Mackie (2005). "The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19144-19149.

- Lazzara, C. A., R. R. Riley, A. Rane, J. K. Andersen and Y. H. Kim (2015). "The combination of lithium and L-Dopa/Carbidopa reduces MPTP-induced abnormal involuntary movements (AIMs) via calpain-1 inhibition in a mouse model: Relevance for Parkinsons disease therapy." *Brain Res* **1622**: 127-136.
- Ledent, C., O. Valverde, G. Cossu, F. Petitet, J. F. Aubert, F. Beslot, G. A. Bohme, A. Imperato, T. Pedrazzini, B. P. Roques, G. Vassart, W. Fratta , M. Parmentier (1999). "Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice." *Science* **283**(5400): 401-404.
- Lemberger, L. , H. Rowe (1975). "Clinical pharmacology of nabilone, a cannabinol derivative." *Clin Pharmacol Ther* **18**(6): 720-726.
- Lewis, M. M., X. Huang, D. E. Nichols , R. B. Mailman (2006). "D1 and functionally selective dopamine agonists as neuroprotective agents in Parkinson's disease." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**(3): 345-353.
- Li, L. , F. M. Zhou (2013). "Parallel dopamine D1 receptor activity dependence of L-Dopa-induced normal movement and dyskinesia in mice." *Neuroscience* **236**: 66-76.
- Liberatore, G. T., V. Jackson-Lewis, S. Vukosavic, A. S. Mandir, M. Vila, W. G. McAuliffe, V. L. Dawson, T. M. Dawson , S. Przedborski (1999). "Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease." *Nat Med* **5**(12): 1403-1409.
- Lichtman, A. H. , B. R. Martin (1996). "Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism." *Psychopharmacology (Berl)* **126**(2): 125-131.
- Lin, M. H., M. C. Chen, T. H. Chen, H. Y. Chang , T. C. Chou (2015). "Magnolol ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through PPAR-gamma-dependent inhibition of NF- κ B activation." *Int Immunopharmacol* **28**(1): 270-278.
- Lindvall, O. (2016). "Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease." *J Intern Med* **279**(1): 30-40.
- Liu, G., C. Sgobio, X. Gu, L. Sun, X. Lin, J. Yu, L. Parisiadou, C. Xie, N. Sastry, J. Ding, K. M. Lohr, G. W. Miller, Y. Mateo, D. M. Lovinger , H. Cai (2015). "Selective expression of Parkinson's disease-related Leucine-rich repeat kinase 2 G2019S missense mutation in midbrain dopaminergic neurons impairs dopamine release and dopaminergic gene expression." *Hum Mol Genet* **24**(18): 5299-5312.
- Liu, J., B. Gao, F. Mirshahi, A. J. Sanyal, A. D. Khanolkar, A. Makriyannis , G. Kunos (2000). "Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells." *Biochem J* **346 Pt 3**: 835-840.
- Liu, J., L. Wang, J. Harvey-White, D. Osei-Hyiaman, R. Razdan, Q. Gong, A. C. Chan, Z. Zhou, B. X. Huang, H. Y. Kim , G. Kunos (2006). "A biosynthetic pathway for anandamide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(36): 13345-13350.
- Livak, K. J. , T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lo Verme, J., J. Fu, G. Astarita, G. La Rana, R. Russo, A. Calignano , D. Piomelli (2005). "The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide." *Mol Pharmacol* **67**(1): 15-19.
- Lograno, M. D. , M. R. Romano (2004). "Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle." *Eur J Pharmacol* **494**(1): 55-62.
- Long, J. Z., W. Li, L. Booker, J. J. Burston, S. G. Kinsey, J. E. Schlosburg, F. J. Pavon, A. M. Serrano, D. E. Selley, L. H. Parsons, A. H. Lichtman , B. F. Cravatt (2009). "Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects." *Nat Chem Biol* **5**(1): 37-44.

- Loonen, A. J. , S. A. Ivanova (2013). "New insights into the mechanism of drug-induced dyskinesia." CNS Spectr **18**(1): 15-20.
- López-Rodríguez, M. L., A. Viso, S. Ortega-Gutiérrez, I. Lastres-Becker, S. González, J. Fernández-Ruiz , J. A. Ramos (2001). "Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors." J Med Chem **44**(26): 4505-4508.
- López de Maturana, R., J. C. Aguila, A. Sousa, N. Vázquez, P. Del Río, A. Aiastui, A. Gorostidi, A. López de Munain , R. Sánchez-Pernaute (2014). "Leucine-rich repeat kinase 2 modulates cyclooxygenase 2 and the inflammatory response in idiopathic and genetic Parkinson's disease." Neurobiol Aging **35**(5): 1116-1124.
- Lorenc-Koci, E., A. Czarnecka, T. Lenda, K. Kaminska , J. Konieczny (2013). "Molsidomine, a nitric oxide donor, modulates rotational behavior and monoamine metabolism in 6-OHDA lesioned rats treated chronically with L-DOPA." Neurochem Int **63**(8): 790-804.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr , R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Luk, T., W. Jin, A. Zvonok, D. Lu, X. Z. Lin, C. Chavkin, A. Makriyannis , K. Mackie (2004). "Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist." Br J Pharmacol **142**(3): 495-500.
- Luthman, J., A. Fredriksson, E. Sundstrom, G. Jonsson , T. Archer (1989). "Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage." Behav Brain Res **33**(3): 267-277.
- Lutz, B. (2007). "The endocannabinoid system and extinction learning." Mol Neurobiol **36**(1): 92-101.
- Lynn, A. B. , M. Herkenham (1994). "Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids." J Pharmacol Exp Ther **268**(3): 1612-1623.
- Ma, L., J. Jia, X. Liu, F. Bai, Q. Wang , L. Xiong (2015). "Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling." Biochem Biophys Res Commun **458**(1): 92-97.
- Maccarrone, M., I. Bab, T. Biro, G. A. Cabral, S. K. Dey, V. Di Marzo, J. C. Konje, G. Kunos, R. Mechoulam, P. Pacher, K. A. Sharkey , A. Zimmer (2015). "Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC." Trends Pharmacol Sci **36**(5): 277-296.
- Maccarrone, M., A. Cartoni, D. Parolaro, A. Margonelli, P. Massi, M. Bari, N. Battista , A. Finazzi-Agro (2002). "Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system." Mol Cell Neurosci **21**(1): 126-140.
- Maccarrone, M., P. Gubellini, M. Bari, B. Picconi, N. Battista, D. Centonze, G. Bernardi, A. Finazzi-Agro , P. Calabresi (2003). "Levodopa treatment reverses endocannabinoid system abnormalities in experimental parkinsonism." J Neurochem **85**(4): 1018-1025.
- Mackie, K. (2005). "Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system." Handb Exp Pharmacol(168): 299-325.
- Madeo, G., T. Schirinzi, M. Maltese, G. Martella, C. Rapino, F. Fezza, N. Mastrangelo, P. Bonsi, M. Maccarrone , A. Pisani (2016). "Dopamine-dependent CB1 receptor dysfunction at corticostriatal synapses in homozygous PINK1 knockout mice." Neuropharmacology **101**: 460-470.
- Madrazo, I., R. Drucker-Colin, V. Diaz, J. Martinez-Mata, C. Torres , J. J. Becerril (1987). "Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease." N Engl J Med **316**(14): 831-834.

- Mahadevan, A., C. Siegel, B. R. Martin, M. E. Abood, I. Beletskaya, R. K. Razdan (2000). "Novel cannabinol probes for CB1 and CB2 cannabinoid receptors." *J Med Chem* **43**(20): 3778-3785.
- Mailleux, P., J. J. Vanderhaeghen (1993). "Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study." *J Neurochem* **61**(5): 1705-1712.
- Makriyannis, A., X. Tian, J. Guo (2005). "How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**(1-4): 210-218.
- Mandrekar-Colucci, S., A. Sauerbeck, P. G. Popovich, D. M. McTigue (2013). "PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases." *ASN Neuro* **5**(5): e00129.
- Maneuf, Y. P., J. E. Nash, A. R. Crossman, J. M. Brochie (1996). "Activation of the cannabinoid receptor by delta 9-tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globus pallidus." *Eur J Pharmacol* **308**(2): 161-164.
- Marsden, C. D. (1983). "Neuromelanin and Parkinson's disease." *J Neural Transm Suppl* **19**: 121-141.
- Marsden, C. D., J. D. Parkes (1977). "Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's Disease." *The Lancet* **309**(8007): 345-349.
- Marsicano, G., B. Moosmann, H. Hermann, B. Lutz, C. Behl (2002). "Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1." *J Neurochem* **80**(3): 448-456.
- Martín, A. B., E. Fernández-Espejo, B. Ferrer, M. A. Gorriti, A. Bilbao, M. Navarro, F. Rodríguez de Fonseca, R. Moratalla (2008). "Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors." *Neuropsychopharmacology* **33**(7): 1667-1679.
- Martin, M., C. Ledent, M. Parmentier, R. Maldonado, O. Valverde (2002). "Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour." *Psychopharmacology (Berl)* **159**(4): 379-387.
- Martinez-Vicente, M. (2015). "Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation." *Semin Cell Dev Biol* **40**: 115-126.
- Martinez, A., T. Macheda, M. G. Morgese, L. Trabace, A. Giuffrida (2012). "The cannabinoid agonist WIN55212-2 decreases L-DOPA-induced PKA activation and dyskinetic behavior in 6-OHDA-treated rats." *Neurosci Res* **72**(3): 236-242.
- Martinez, A. A., M. G. Morgese, A. Pisanu, T. Macheda, M. A. Paquette, A. Seillier, T. Cassano, A. R. Carta, A. Giuffrida (2015). "Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats." *Neurobiol Dis* **74**: 295-304.
- Marx, V. (2015). "Autophagy: eat thyself, sustain thyself." *Nat Meth* **12**(12): 1121-1125.
- Matsuda, L. A. (1997). "Molecular aspects of cannabinoid receptors." *Crit Rev Neurobiol* **11**(2-3): 143-166.
- Matsuura, K., H. Kabuto, H. Makino, N. Ogawa (1997). "Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion." *J Neurosci Methods* **73**(1): 45-48.
- McAllister, S. D., G. Griffin, L. S. Satin, M. E. Abood (1999). "Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system." *J Pharmacol Exp Ther* **291**(2): 618-626.
- McFarland, M. J., A. C. Porter, F. R. Rakhshan, D. S. Rawat, R. A. Gibbs, E. L. Barker (2004). "A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide." *J Biol Chem* **279**(40): 41991-41997.

McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes , E. G. McGeer (1988). "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains." Neurology **38**(8): 1285-1291.

McKinney, M. K. , B. F. Cravatt (2003). "Evidence for distinct roles in catalysis for residues of the serine-serine-lysine catalytic triad of fatty acid amide hydrolase." J Biol Chem **278**(39): 37393-37399.

McNaught, K. S. , P. Jenner (2001). "Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease." Neurosci Lett **297**(3): 191-194.

McNaught, K. S., P. Shashidharan, D. P. Perl, P. Jenner , C. W. Olanow (2002). "Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies." Eur J Neurosci **16**(11): 2136-2148.

McHugh, D., J. Page, E. Dunn , H. B. Bradshaw (2012). "Delta(9) -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells." Br J Pharmacol **165**(8): 2414-2424.

Mecha, M., A. Feliú, F. J. Carrillo-Salinas, A. Rueda-Zubiaurre, S. Ortega-Gutierrez, R. G. de Sola , C. Guaza (2015). "Endocannabinoids drive the acquisition of an alternative phenotype in microglia." Brain Behav Immun **49**: 233-245.

Mecha, M., A. Feliu, P. M. Inigo, L. Mestre, F. J. Carrillo-Salinas , C. Guaza (2013). "Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors." Neurobiol Dis **59**: 141-150.

Mechoulam, R., S. Ben-Shabat, L. Hanus, M. Ligumsky, N. E. Kaminski, A. R. Schatz, A. Gopher, S. Almog, B. R. Martin, D. R. Compton , et al. (1995). "Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors." Biochem Pharmacol **50**(1): 83-90.

Mechoulam, R., J. J. Feigenbaum, N. Lander, M. Segal, T. U. Jarbe, A. J. Hiltunen , P. Consroe (1988). "Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic activity." Experientia **44**(9): 762-764.

Mechoulam, R. , Y. Gaoni (1965). "A Total Synthesis of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish." J Am Chem Soc **87**: 3273-3275.

Mechoulam, R. , L. Hanu (2001). "The cannabinoids: an overview. Therapeutic implications in vomiting and nausea after cancer chemotherapy, in appetite promotion, in multiple sclerosis and in neuroprotection." Pain Res Manag **6**(2): 67-73.

Mechoulam, R., L. O. Hanus, R. Pertwee , A. C. Howlett (2014). "Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond." Nat Rev Neurosci **15**(11): 757-764.

Mechoulam, R., N. Lander, T. H. Varkony, I. Kimmel, O. Becker, Z. Ben-Zvi, H. Edery , G. Porath (1980). "Stereochemical requirements for cannabinoid activity." J Med Chem **23**(10): 1068-1072.

Mechoulam, R. , Y. Shvo (1963). "Hashish. I. The structure of cannabidiol." Tetrahedron **19**(12): 2073-2078.

Meredith, G. E., P. K. Sonsalla , M. F. Chesselet (2008). "Animal models of Parkinson's disease progression." Acta Neuropathol **115**(4): 385-398.

Meschler, J. P., A. C. Howlett , B. K. Madras (2001). "Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates." Psychopharmacology (Berl) **156**(1): 79-85.

Mesnager, V., J. L. Houeto, A. M. Bonnet, I. Clavier, I. Arnulf, F. Cattelin, G. Le Fur, P. Damier, M. L. Welter , Y. Agid (2004). "Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson disease." Clin Neuropharmacol **27**(3): 108-110.

Mestre, L., F. Docagne, F. Correa, F. Loria, M. Hernangomez, J. Borrell , C. Guaza (2009). "A cannabinoid agonist interferes with the progression of a chronic model of multiple sclerosis by downregulating adhesion molecules." Mol Cell Neurosci **40**(2): 258-266.

- Miglio, G., L. Rattazzi, A. C. Rosa, R. Fantozzi (2009). "PPARgamma stimulation promotes neurite outgrowth in SH-SY5Y human neuroblastoma cells." *Neurosci Lett* **454**(2): 134-138.
- Mizuno, Y., S. Matuda, H. Yoshino, H. Mori, N. Hattori, S. Ikebe (1994). "An immunohistochemical study on alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease." *Ann Neurol* **35**(2): 204-210.
- Mizuno, Y., N. Sone, T. Saitoh (1987). "Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain." *J Neurochem* **48**(6): 1787-1793.
- Moehle, M. S., P. J. Webber, T. Tse, N. Sukar, D. G. Standaert, T. M. DeSilva, R. M. Cowell, A. B. West (2012). "LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses." *J Neurosci* **32**(5): 1602-1611.
- Molina-Holgado, E., J. M. Vela, A. Arevalo-Martin, G. Almazan, F. Molina-Holgado, J. Borrell, C. Guaza (2002). "Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling." *J Neurosci* **22**(22): 9742-9753.
- Molina-Holgado, F., C. Guaza, N. J. Rothwell (2002). "Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures." *J Neurosci Res* **67**(6): 829-836.
- Molina-Holgado, F., A. Lledo, C. Guaza (1997). "Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes." *Neuroreport* **8**(8): 1929-1933.
- Molina-Holgado, F., E. Pinteaux, J. D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R. M. Gibson, N. J. Rothwell (2003). "Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia." *J Neurosci* **23**(16): 6470-6474.
- Mombouli, J. V., G. Schaeffer, S. Holzmann, G. M. Kostner, W. F. Graier (1999). "Anandamide-induced mobilization of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells." *Br J Pharmacol* **126**(7): 1593-1600.
- Moncada, S., J. P. Bolaños (2006). "Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration." *J Neurochem* **97**(6): 1676-1689.
- Monville, C., E. M. Torres, S. B. Dunnett (2006). "Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model." *J Neurosci Methods* **158**(2): 219-223.
- Moody, J. S., K. R. Kozak, C. Ji, L. J. Marnett (2001). "Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase." *Biochemistry* **40**(4): 861-866.
- Mor, M., S. Rivara, A. Lodola, P. V. Plazzi, G. Tarzia, A. Duranti, A. Tontini, G. Piersanti, S. Kathuria, D. Piomelli (2004). "Cyclohexylcarbamic acid 3'- or 4'-substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure-activity relationships, and molecular modeling studies." *J Med Chem* **47**(21): 4998-5008.
- Moraes, L. A., L. Piqueras, D. Bishop-Bailey (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation." *Pharmacol Ther* **110**(3): 371-385.
- Moreno-Martet, M., A. Feliu, F. Espejo-Porras, M. Mecha, F. J. Carrillo-Salinas, J. Fernández-Ruiz, C. Guaza, E. de Lago (2015). "The disease-modifying effects of a Sativex-like combination of phytocannabinoids in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis are preferentially due to Delta9-tetrahydrocannabinol acting through CB1 receptors." *Mult Scler Relat Disord* **4**(6): 505-511.
- Moreno, S., S. Farioli-Vecchioli, M. P. Ceru (2004). "Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS." *Neuroscience* **123**(1): 131-145.
- Morgan, N. H., I. M. Stanford, G. L. Woodhall (2009). "Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses." *Neuropharmacology* **57**(4): 356-368.

Morgese, M. G., T. Cassano, V. Cuomo, A. Giuffrida (2007). "Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors." Exp Neurol **208**(1): 110-119.

Moser, E. (1989). "[Skeletal scintigraphic findings in spinal diseases]." Radiologe **29**(4): 164-169.

Mukhopadhyay, P., M. Rajesh, H. Pan, V. Patel, B. Mukhopadhyay, S. Batkai, B. Gao, G. Hasko, P. Pacher (2010). "Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy." Free Radic Biol Med **48**(3): 457-467.

Munro, S., K. L. Thomas, M. Abu-Shaar (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." Nature **365**(6441): 61-65.

Murineddu, G., F. Deligia, A. Dore, G. Pinna, B. Asproni, G. A. Pinna (2013). "Different classes of CB2 ligands potentially useful in the treatment of pain." Recent Pat CNS Drug Discov **8**(1): 42-69.

Nadal, X., C. La Porta, S. Andreea Bura, R. Maldonado (2013). "Involvement of the opioid and cannabinoid systems in pain control: new insights from knockout studies." Eur J Pharmacol **716**(1-3): 142-157.

Nagatsu, T., M. Sawada (2007). "Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects." J Neural Transm Suppl(72): 113-120.

Nakane, S., S. Oka, S. Arai, K. Waku, Y. Ishima, A. Tokumura, T. Sugiura (2002). "2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain." Arch Biochem Biophys **402**(1): 51-58.

Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen, R. J. Youle (2008). "Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy." J Cell Biol **183**(5): 795-803.

Navarrete, M., A. Araque (2010). "Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes." Neuron **68**(1): 113-126.

Navarrete, M., A. Díez, A. Araque (2014). "Astrocytes in endocannabinoid signalling." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1654): 20130599.

Netzeband, J. G., S. M. Conroy, K. L. Parsons, D. L. Gruol (1999). "Cannabinoids enhance NMDA-elicited Ca²⁺ signals in cerebellar granule neurons in culture." J Neurosci **19**(20): 8765-8777.

Núñez, E., C. Benito, M. R. Pazos, A. Barbachano, O. Fajardo, S. González, R. M. Tolón, J. Romero (2004). "Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study." Synapse **53**(4): 208-213.

Nyilas, R., L. C. Gregg, K. Mackie, M. Watanabe, A. Zimmer, A. G. Hohmann, I. Katona (2009). "Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia." Eur J Neurosci **29**(10): 1964-1978.

O'Shaughnessy, W. B. (1841). The Bengal Dispensatory and Pharmacopoeia: Chiefly Compiled from the Works of Roxburgh, Wallich, Ainslie, Wight and Arnot, Royle, Pereira, Lindley, Richard, and Fee, and Including the Results of Numerous Special Experiments, Bishop's College Press.

O'Sullivan, S. E., D. A. Kendall (2010). "Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease." Immunobiology **215**(8): 611-616.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, C. G. Goetz, C. Marin, J. H. Kordower, M. Rodriguez, E. C. Hirsch, M. Farrer, A. H. Schapira, G. Halliday (2010). "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle." Nat Med **16**(6): 653-661.

Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, A. Red Eagle, D. Vats, C. R. Morel, M. H. Goforth, V. Subramanian, L. Mukundan, A. W. Ferrante, A. Chawla (2008). "Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance." Cell Metab **7**(6): 496-507.

Ofek, O., M. Karsak, N. Leclerc, M. Fogel, B. Frenkel, K. Wright, J. Tam, M. Attar-Namdar, V. Kram, E. Shohami, R. Mechoulam, A. Zimmer, I. Bab (2006). "Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 696-701.

Ogawa, N., Y. Hirose, S. Ohara, T. Ono, Y. Watanabe (1985). "A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **50**(3): 435-441.

Oh, Y. T., J. Y. Lee, J. Lee, J. H. Lee, J. E. Kim, J. Ha, I. Kang (2010). "Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF-kappaB activation in BV2 murine microglial cells." Neurosci Lett **474**(3): 148-153.

Olivan, S., A. C. Calvo, S. Gasco, M. J. Munoz, P. Zaragoza, R. Osta (2015). "Time-Point Dependent Activation of Autophagy and the UPS in SOD1G93A Mice Skeletal Muscle." PLoS One **10**(8): e0134830.

Onaivi, E. S., H. Ishiguro, J. P. Gong, S. Patel, P. A. Meozzi, L. Myers, A. Perchuk, Z. Mora, P. A. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B. E. Akinshola, Q. R. Liu, S. S. Chirwa, B. Hope, J. Lujilde, T. Inada, S. Iwasaki, D. Macharia, L. Teasenfitz, T. Arinami, G. R. Uhl (2008). "Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression." Ann N Y Acad Sci **1139**: 434-449.

Onaivi, E. S., H. Ishiguro, J. P. Gong, S. Patel, A. Perchuk, P. A. Meozzi, L. Myers, Z. Mora, P. Tagliaferro, E. Gardner, A. Brusco, B. E. Akinshola, Q. R. Liu, B. Hope, S. Iwasaki, T. Arinami, L. Teasenfitz, G. R. Uhl (2006). "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain." Ann N Y Acad Sci **1074**: 514-536.

Onaivi, E. S., H. Ishiguro, S. Gu, Q. R. Liu (2012). "CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity." J Psychopharmacol **26**(1): 92-103.

Ossowska, K., J. Konieczny, J. Wardas, M. Pietraszek, K. Kuter, S. Wolfarth, A. Pilc (2007). "An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats." Amino Acids **32**(2): 179-188.

Ouchi, Y., E. Yoshikawa, Y. Sekine, M. Futatsubashi, T. Kanno, T. Ogusu, T. Torizuka (2005). "Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease." Ann Neurol **57**(2): 168-175.

Overton, H. A., A. J. Babbs, S. M. Doel, M. C. Fyfe, L. S. Gardner, G. Griffin, H. C. Jackson, M. J. Procter, C. M. Rasamison, M. Tang-Christensen, P. S. Widdowson, G. M. Williams, C. Reynet (2006). "Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents." Cell Metab **3**(3): 167-175.

Pacher, P., S. Steffens (2009). "The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease." Semin Immunopathol **31**(1): 63-77.

Padovan-Neto, F. E., M. B. Echeverry, V. Tumas, E. A. Del-Bel (2009). "Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease." Neuroscience **159**(3): 927-935.

Paisán-Ruiz, C., S. Jain, E. W. Evans, W. P. Gilks, J. Simón, M. van der Brug, A. López de Munain, S. Aparicio, A. M. Gil, N. Khan, J. Johnson, J. R. Martinez, D. Nicholl, I. M. Carrera, A. S. Pena, R. de Silva, A. Lees, J. F. Martí-Massó, J. Pérez-Tur, N. W. Wood, A. B. Singleton (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron **44**(4): 595-600.

Paisán-Ruiz, C., P. A. Lewis, A. B. Singleton (2013). "LRRK2: cause, risk, and mechanism." J Parkinsons Dis **3**(2): 85-103.

Palazuelos, J., T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzmán , I. Galve-Roperh (2006). "Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation." FASEB J **20**(13): 2405-2407.

Palazuelos, J., T. Aguado, M. R. Pazos, B. Julien, C. Carrasco, E. Resel, O. Sagredo, C. Benito, J. Romero, I. Azcoitia, J. Fernández-Ruiz, M. Guzmán , I. Galve-Roperh (2009). "Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity." Brain **132**(Pt 11): 3152-3164.

Palkovits, M. (1988). Maps and guide to microdissection of the rat brain, New York : Elsevier, [1988] ©1988.

Parkinson, J. (1817). An essay on shaking palsy. London, Sherwood Neely and Jones.

Parkinson Study Group (1996). Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. Parkinson Study Group. . Ann Neurol. **39**: 37-45.

Pavón, N., A. B. Martín, A. Mendiadua , R. Moratalla (2006). "ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice." Biol Psychiatry **59**(1): 64-74.

Paxinos, G. , C. Watson (1986). "The rat in stereotaxic coordinates." Academic Press, San Diego, CA.

Pellkofer, H. L., J. Havla, D. Hauer, G. Schelling, S. C. Azad, T. Kuempfel, W. Magerl , V. Hugel (2013). "The major brain endocannabinoid 2-AG controls neuropathic pain and mechanical hyperalgesia in patients with neuromyelitis optica." PLoS One **8**(8): e71500.

Pérez-Alvarez, A. , A. Araque (2013). "Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses." Curr Drug Targets **14**(11): 1220-1224.

Pertwee, R., G. Griffin, S. Fernando, X. Li, A. Hill , A. Makriyannis (1995). "AM630, a competitive cannabinoid receptor antagonist." Life Sci **56**(23-24): 1949-1955.

Pertwee, R. G. (1997). "Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors." Pharmacol Ther **74**(2): 129-180.

Pertwee, R. G. (1999). "Pharmacology of cannabinoid receptor ligands." Curr Med Chem **6**(8): 635-664.

Pertwee, R. G. (2008). "The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin." Br J Pharmacol **153**(2): 199-215.

Pertwee, R. G., A. C. Howlett, M. E. Abood, S. P. Alexander, V. Di Marzo, M. R. Elphick, P. J. Greasley, H. S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie, R. Mechoulam , R. A. Ross (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2)." Pharmacol Rev **62**(4): 588-631.

Pertwee, R. G. , R. A. Ross (2002). "Cannabinoid receptors and their ligands." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **66**(2-3): 101-121.

Pertwee, R. G., A. Thomas, L. A. Stevenson, R. A. Ross, S. A. Varvel, A. H. Lichtman, B. R. Martin , R. K. Razdan (2007). "The psychoactive plant cannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol, is antagonized by Delta8- and Delta9-tetrahydrocannabivarin in mice in vivo." Br J Pharmacol **150**(5): 586-594.

Petit, G. H., T. T. Olsson , P. Brundin (2014). "The future of cell therapies and brain repair: Parkinson's disease leads the way." Neuropathol Appl Neurobiol **40**(1): 60-70.

Pezzoli, G. , M. Zini (2010). "Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future." Expert Opin Pharmacother **11**(4): 627-635.

- Pickel, V. M., J. Chan, C. S. Kearn, K. Mackie (2006). "Targeting dopamine D2 and cannabinoid-1 (CB1) receptors in rat nucleus accumbens." *J Comp Neurol* **495**(3): 299-313.
- Pisani, A., F. Fezza, S. Galati, N. Battista, S. Napolitano, A. Finazzi-Agro, G. Bernardi, L. Brusa, M. Pierantozzi, P. Stanzione, M. Maccarrone (2005). "High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients." *Ann Neurol* **57**(5): 777-779.
- Pisani, V., G. Madeo, A. Tassone, G. Sciamanna, M. Maccarrone, P. Stanzione, A. Pisani (2011). "Homeostatic changes of the endocannabinoid system in Parkinson's disease." *Mov Disord* **26**(2): 216-222.
- Plomp, J. J., M. Morsch, W. D. Phillips, J. J. Verschuuren (2015). "Electrophysiological analysis of neuromuscular synaptic function in myasthenia gravis patients and animal models." *Exp Neurol* **270**: 41-54.
- Plowey, E. D., C. T. Chu (2011). "Synaptic dysfunction in genetic models of Parkinson's disease: a role for autophagy?" *Neurobiol Dis* **43**(1): 60-67.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, E. Leroy, S. E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E. S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W. G. Johnson, A. M. Lazzarini, R. C. Duvoisin, G. Di Iorio, L. I. Golbe, R. L. Nussbaum (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." *Science* **276**(5321): 2045-2047.
- Porter, A. C., J. M. Sauer, M. D. Knierman, G. W. Becker, M. J. Borna, J. Bao, G. G. Nomikos, P. Carter, F. P. Bymaster, A. B. Leese, C. C. Felder (2002). "Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **301**(3): 1020-1024.
- Prenderville, J. A., A. M. Kelly, E. J. Downer (2015). "The role of cannabinoids in adult neurogenesis." *Br J Pharmacol* **172**(16): 3950-3963.
- Price, D. A., A. A. Martinez, A. Seillier, W. Koek, Y. Acosta, E. Fernandez, R. Strong, B. Lutz, G. Marsicano, J. L. Roberts, A. Giuffrida (2009). "WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease." *Eur J Neurosci* **29**(11): 2177-2186.
- Price, M. R., G. L. Baillie, A. Thomas, L. A. Stevenson, M. Easson, R. Goodwin, A. McLean, L. McIntosh, G. Goodwin, G. Walker, P. Westwood, J. Marrs, F. Thomson, P. Cowley, A. Christopoulos, R. G. Pertwee, R. A. Ross (2005). "Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor." *Mol Pharmacol* **68**(5): 1484-1495.
- Price, T. J., A. Patwardhan, A. N. Akopian, K. M. Hargreaves, C. M. Flores (2004). "Modulation of trigeminal sensory neuron activity by the dual cannabinoid-vanilloid agonists anandamide, N-arachidonoyl-dopamine and arachidonyl-2-chloroethylamide." *Br J Pharmacol* **141**(7): 1118-1130.
- Pruitt, K. D., T. Tatusova, D. R. Maglott (2007). "NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins." *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D61-65.
- Pryce, G., D. R. Riddall, D. L. Selwood, G. Giovannoni, D. Baker (2015). "Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Progressive Multiple Sclerosis by Cannabis-Based Cannabinoids." *J Neuroimmune Pharmacol* **10**(2): 281-292.
- Przedborski, S. (2007). "Neuroinflammation and Parkinson's disease." *Handb Clin Neurol* **83**: 535-551.
- Przedborski, S., M. Levivier, H. Jiang, M. Ferreira, V. Jackson-Lewis, D. Donaldson, D. M. Togasaki (1995). "Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine." *Neuroscience* **67**(3): 631-647.

Puighermanal, E., G. Marsicano, A. Busquets-Garcia, B. Lutz, R. Maldonado, A. Ozaita (2009). "Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling." Nat Neurosci **12**(9): 1152-1158.

Qin, N., M. P. Neeper, Y. Liu, T. L. Hutchinson, M. L. Lubin, C. M. Flores (2008). "TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons." J Neurosci **28**(24): 6231-6238.

Ramirez, B. G., C. Blazquez, T. Gomez del Pulgar, M. Guzman, M. L. de Ceballos (2005). "Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation." J Neurosci **25**(8): 1904-1913.

Ramonet, D., J. P. Daher, B. M. Lin, K. Stafa, J. Kim, R. Banerjee, M. Westerlund, O. Pletnikova, L. Glauser, L. Yang, Y. Liu, D. A. Swing, M. F. Beal, J. C. Troncoso, J. M. McCaffery, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, D. Galter, B. Thomas, M. K. Lee, T. M. Dawson, V. L. Dawson, D. J. Moore (2011). "Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2." PLoS One **6**(4): e18568.

Rappold, P. M., K. Tieu (2010). "Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease." Neurotherapeutics **7**(4): 413-423.

Rawls, S. M., R. J. Tallarida, D. A. Kon, E. B. Geller, M. W. Adler (2004). "GABAA receptors modulate cannabinoid-evoked hypothermia." Pharmacol Biochem Behav **78**(1): 83-91.

Rentzos, M., C. Nikolaou, E. Andreadou, G. P. Paraskevas, A. Rombos, M. Zoga, A. Tsoutsou, F. Boufidou, E. Kapaki, D. Vassilopoulos (2007). "Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **116**(6): 374-379.

Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, M. Heaulme, D. Shire, B. Calandra, C. Congy, S. Martinez, J. Maruani, G. Nélis, D. Caput, et al. (1994). "SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor." FEBS Lett **350**(2-3): 240-244.

Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, J. Millan, J. M. Derocq, P. Casellas, C. Congy, D. Oustric, M. Sarran, M. Bouaboula, B. Calandra, M. Portier, D. Shire, J. C. Breliere, G. L. Le Fur (1998). "SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor." J Pharmacol Exp Ther **284**(2): 644-650.

Robbe, D., G. Alonso, F. Duchamp, J. Bockaert, O. J. Manzoni (2001). "Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens." J Neurosci **21**(1): 109-116.

Rock, E. M., N. Boulet, C. L. Limebeer, R. Mechoulam, L. A. Parker (2016). "Cannabinoid 2 (CB2) receptor agonism reduces lithium chloride-induced vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced conditioned gaping in rats." Eur J Pharmacol **786**: 94-99.

Roche, R., L. Hoareau, S. Bes-Houtmann, M. P. Gonthier, C. Laborde, J. F. Baron, Y. Haffaf, M. Cesari, F. Festy (2006). "Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes." Histochem Cell Biol **126**(2): 177-187.

Rodríguez-Cueto, C., C. Benito, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, M. Hernández-Gálvez, M. Gómez-Ruiz (2014). "Changes in CB(1) and CB(2) receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias." Br J Pharmacol **171**(6): 1472-1489.

Rodríguez-Cueto, C., C. Benito, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, M. Hernández-Gálvez, M. Gómez-Ruiz (2014). "Changes in CB(1) and CB(2) receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias." Br J Pharmacol **171**(6): 1472-1489.

Rodríguez Díaz, M., P. Abdala, P. Barroso-Chinea, J. Obeso, T. González-Hernández (2001). "Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease." Behav Brain Res **122**(1): 79-92.

Romero-Sandoval, A., J. C. Eisenach (2007). "Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision." Anesthesiology **106**(4): 787-794.

Romero, J., L. García, M. Cebeira, D. Zadrozny, J. J. Fernández-Ruiz, J. A. Ramos (1995). "The endogenous cannabinoid receptor ligand, anandamide, inhibits the motor behavior: role of nigrostriatal dopaminergic neurons." Life Sci **56**(23-24): 2033-2040.

Romero, J., C. J. Hillard, M. Calero, A. Rabano (2002). "Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study." Brain Res Mol Brain Res **100**(1-2): 85-93.

Romero, J., C. J. Hillard, M. Calero, A. Rábano (2002). "Fatty acid amide hydrolase localization in the human central nervous system: an immunohistochemical study." Brain Res Mol Brain Res **100**(1-2): 85-93.

Ross, R. A. (2007). "Tuning the endocannabinoid system: allosteric modulators of the CB1 receptor." Br J Pharmacol **152**(5): 565-566.

Ross, R. A. (2009). "The enigmatic pharmacology of GPR55." Trends Pharmacol Sci **30**(3): 156-163.

Rubio-Araiz, A., A. Arévalo-Martín, O. Gómez-Torres, B. Navarro-Galve, D. García-Ovejero, P. Suetterlin, E. Sánchez-Heras, E. Molina-Holgado, F. Molina-Holgado (2008). "The endocannabinoid system modulates a transient TNF pathway that induces neural stem cell proliferation." Mol Cell Neurosci **38**(3): 374-380.

Rueda, D., I. Galve-Roperh, A. Haro, M. Guzmán (2000). "The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase." Mol Pharmacol **58**(4): 814-820.

Rueda, D., B. Navarro, A. Martínez-Serrano, M. Guzmán, I. Galve-Roperh (2002). "The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway." J Biol Chem **277**(48): 46645-46650.

Ruiz-DeDiego, I., B. Mellstrom, M. Vallejo, J. R. Naranjo, R. Moratalla (2015). "Activation of DREAM (downstream regulatory element antagonistic modulator), a calcium-binding protein, reduces L-DOPA-induced dyskinesias in mice." Biol Psychiatry **77**(2): 95-105.

Sagar, D. R., M. D. Jhaveri, D. Richardson, R. A. Gray, E. de Lago, J. Fernández-Ruiz, D. A. Barrett, D. A. Kendall, V. Chapman (2010). "Endocannabinoid regulation of spinal nociceptive processing in a model of neuropathic pain." Eur J Neurosci **31**(8): 1414-1422.

Saggu, H., J. Cooksey, D. Dexter, F. R. Wells, A. Lees, P. Jenner, C. D. Marsden (1989). "A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra." J Neurochem **53**(3): 692-697.

Sagredo, O., M. García-Arencibia, E. de Lago, S. Finetti, A. Decio, J. Fernández-Ruiz (2007). "Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders." Mol Neurobiol **36**(1): 82-91.

Sagredo, O., S. Gonzalez, I. Aroyo, M. R. Pazos, C. Benito, I. Lastres-Becker, J. P. Romero, R. M. Tolon, R. Mechoulam, E. Brouillet, J. Romero, J. Fernandez-Ruiz (2009). "Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease." Glia **57**(11): 1154-1167.

Salazar, M., A. Carracedo, I. J. Salanueva, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vazquez, C. Blazquez, S. Torres, S. Garcia, J. Nowak, G. M. Fimia, M. Piacentini, F. Cecconi, P. P. Pandolfi, L. Gonzalez-Feria, J. L. Iovanna, M. Guzman, P. Boya, G. Velasco (2009). "Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells." J Clin Invest **119**(5): 1359-1372.

- Sallan, S. E., N. E. Zinberg, E. Frei, 3rd (1975). "Antiemetic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol in patients receiving cancer chemotherapy." N Engl J Med **293**(16): 795-797.
- Sánchez-Blázquez, P., M. Rodríguez-Muñoz, R. Herrero-Labrador, J. Burgueño, D. Zamanillo, J. Garzón (2014). "The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases." Int J Neuropsychopharmacol **17**(12): 1943-1955.
- Sánchez, C., I. Galve-Roperh, D. Rueda, M. Guzmán (1998). "Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes." Mol Pharmacol **54**(5): 834-843.
- Sánchez, C., D. Rueda, B. Segui, I. Galve-Roperh, T. Levade, M. Guzmán (2001). "The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein *fan*." Mol Pharmacol **59**(5): 955-959.
- Sañudo-Peña, M. C., K. Tsou, J. M. Walker (1999). "Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei." Life Sci **65**(6-7): 703-713.
- Sañudo-Peña, M. C., J. M. Walker (1997). "Role of the subthalamic nucleus in cannabinoid actions in the substantia nigra of the rat." J Neurophysiol **77**(3): 1635-1638.
- Sarre, S., H. Yuan, N. Jonkers, A. Van Hemelrijck, G. Ebinger, Y. Michotte (2004). "In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats." J Neurochem **90**(1): 29-39.
- Sattler, R., M. Tymianski (2000). "Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity." J Mol Med (Berl) **78**(1): 3-13.
- Sauer, H., W. H. Oertel (1994). "Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastratial terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat." Neuroscience **59**(2): 401-415.
- Sayers, E. W., T. Barrett, D. A. Benson, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, R. Edgar, S. Federhen, M. Feolo, L. Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, D. Landsman, D. J. Lipman, T. L. Madden, D. R. Maglott, V. Miller, I. Mizrachi, J. Ostell, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, E. Sequeira, S. T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, A. Souvorov, G. Starchenko, T. A. Tatusova, L. Wagner, E. Yaschenko, J. Ye (2009). "Database resources of the National Center for Biotechnology Information." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D5-15.
- Scuderi, C., L. Steardo, G. Esposito (2014). "Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPARgamma involvement." Phytother Res **28**(7): 1007-1013.
- Schapira, A. H. (2008). "The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease." Mov Disord **23 Suppl 3**: S515-520.
- Schapira, A. H. (2008). "Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Lancet Neurol **7**(1): 97-109.
- Schapira, A. H. (2011). "Mitochondrial pathology in Parkinson's disease." Mt Sinai J Med **78**(6): 872-881.
- Schapira, A. H., J. M. Cooper, D. Dexter, J. B. Clark, P. Jenner, C. D. Marsden (1990). "Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease." J Neurochem **54**(3): 823-827.
- Schapira, A. H., P. Jenner (2011). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Mov Disord **26**(6): 1049-1055.
- Schmidt, W., F. Schafer, V. Striggow, K. Frohlich, F. Striggow (2012). "Cannabinoid receptor subtypes 1 and 2 mediate long-lasting neuroprotection and improve motor behavior deficits after transient focal cerebral ischemia." Neuroscience **227**: 313-326.

- Schneider, C. A., W. S. Rasband , K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Meth **9**(7): 671-675.
- Schnell, S. A., W. A. Staines , M. W. Wessendorf (1999). "Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue." J Histochem Cytochem **47**(6): 719-730.
- Shaikh, K. T., A. Yang, E. Youshin , S. Schmid (2015). "Transgenic LRRK2 (R1441G) rats-a model for Parkinson disease?" PeerJ **3**: e945.
- Shan, L., O. Diaz, Y. Zhang, B. Ladenheim, J. L. Cadet, Y. H. Chiang, L. Olson, B. J. Hoffer , C. M. Backman (2015). "L-Dopa induced dyskinesias in Parkinsonian mice: Disease severity or L-Dopa history." Brain Res **1618**: 261-269.
- Sharir, H. , M. E. Abood (2010). "Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor." Pharmacol Ther **126**(3): 301-313.
- Sheng, W. S., S. Hu, H. T. Ni, R. B. Rock , P. K. Peterson (2009). "WIN55,212-2 inhibits production of CX3CL1 by human astrocytes: involvement of p38 MAP kinase." J Neuroimmune Pharmacol **4**(2): 244-248.
- Shore, D. M. , P. H. Reggio (2015). "The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55." Front Pharmacol **6**: 69.
- Sian, J., D. T. Dexter, A. J. Lees, S. Daniel, Y. Agid, F. Javoy-Agid, P. Jenner , C. D. Marsden (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-355.
- Sieradzan, K. A., S. H. Fox, M. Hill, J. P. Dick, A. R. Crossman , J. M. Brotchie (2001). "Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study." Neurology **57**(11): 2108-2111.
- Sierra, S., N. Luquin, A. J. Rico, V. Gomez-Bautista, E. Roda, I. G. Dopeso-Reyes, A. Vazquez, E. Martinez-Pinilla, J. L. Labandeira-Garcia, R. Franco , J. L. Lanciego (2015). "Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism." Brain Struct Funct **220**(5): 2721-2738.
- Silvestri, C. , V. Di Marzo (2012). "Second generation CB1 receptor blockers and other inhibitors of peripheral endocannabinoid overactivity and the rationale of their use against metabolic disorders." Expert Opin Investig Drugs **21**(9): 1309-1322.
- Simon, G. M. , B. F. Cravatt (2010). "Characterization of mice lacking candidate N-acyl ethanolamine biosynthetic enzymes provides evidence for multiple pathways that contribute to endocannabinoid production in vivo." Mol Biosyst **6**(8): 1411-1418.
- Skaper, S. D., A. Buriani, R. Dal Toso, L. Petrelli, S. Romanello, L. Facci , A. Leon (1996). "The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3984-3989.
- Smith, L. A., F. Azariah, V. T. Lavender, N. S. Stoner , S. Bettiol (2015). "Cannabinoids for nausea and vomiting in adults with cancer receiving chemotherapy." Cochrane Database Syst Rev(11): CD009464.
- Smith, S. R., C. Terminelli , G. Denhardt (2000). "Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice." J Pharmacol Exp Ther **293**(1): 136-150.
- Snider, N. T., V. J. Walker , P. F. Hollenberg (2010). "Oxidation of the endogenous cannabinoid arachidonoyl ethanolamide by the cytochrome P450 monooxygenases: physiological and pharmacological implications." Pharmacol Rev **62**(1): 136-154.
- Sofroniew, M. V., C. L. Howe , W. C. Mobley (2001). "Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair." Annu Rev Neurosci **24**: 1217-1281.

Solís, O., I. Espadas, E. A. Del-Bel , R. Moratalla (2015). "Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3(-/-) aphakia mice." Neurobiol Dis **73**: 49-59.

Solorzano-Santos, F. , M. G. Miranda-Novales (2012). "Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents." Curr Opin Biotechnol **23**(2): 136-141.

Son, J. H., J. H. Shim, K. H. Kim, J. Y. Ha , J. Y. Han (2012). "Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases." Exp Mol Med **44**(2): 89-98.

Spillantini, M. G., R. A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa , M. Goedert (1998). "alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6469-6473.

Starowicz, K., S. Nigam , V. Di Marzo (2007). "Biochemistry and pharmacology of endovanilloids." Pharmacol Ther **114**(1): 13-33.

Steece-Collier, K., D. J. Rademacher , K. Soderstrom (2012). "Anatomy of Graft-induced Dyskinesias: Circuit Remodeling in the Parkinsonian Striatum." Basal Ganglia **2**(1): 15-30.

Steigerwald, F., M. Potter, J. Herzog, M. Pinsker, F. Kopper, H. Mehdorn, G. Deuschl , J. Volkmann (2008). "Neuronal activity of the human subthalamic nucleus in the parkinsonian and nonparkinsonian state." J Neurophysiol **100**(5): 2515-2524.

Stella, N. (2004). "Cannabinoid signaling in glial cells." Glia **48**(4): 267-277.

Stella, N. (2010). "Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas." Glia **58**(9): 1017-1030.

Stienstra, R., C. Duval, M. Muller , S. Kersten (2007). "PPARs, Obesity, and Inflammation." PPAR Res **2007**: 95974.

Storr, M., E. Gaffal, D. Saur, V. Schusdziarra , H. D. Allescher (2002). "Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus." Can J Physiol Pharmacol **80**(1): 67-76.

Streit, W. J., R. E. Mrak , W. S. Griffin (2004). "Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective." J Neuroinflammation **1**(1): 14.

Sugiura, T., S. Kondo, A. Sukagawa, S. Nakane, A. Shinoda, K. Itoh, A. Yamashita , K. Waku (1995). "2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain." Biochem Biophys Res Commun **215**(1): 89-97.

Sun, X., X. Shi, L. Lu, Y. Jiang , B. Liu (2016). "Stimulus-dependent neuronal cell responses in SH-SY5Y neuroblastoma cells." Mol Med Rep **13**(3): 2215-2220.

Sun, Y., S. P. Alexander, M. J. Garle, C. L. Gibson, K. Hewitt, S. P. Murphy, D. A. Kendall , A. J. Bennett (2007). "Cannabinoid activation of PPAR alpha; a novel neuroprotective mechanism." Br J Pharmacol **152**(5): 734-743.

Sun, Y. , A. Bennett (2007). "Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs." PPAR Res **2007**: 23513.

Sun, Y. X., K. Tsuboi, Y. Okamoto, T. Tonai, M. Murakami, I. Kudo , N. Ueda (2004). "Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D." Biochem J **380**(Pt 3): 749-756.

Surmeier, D. J. (2007). "Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease." Lancet Neurol **6**(10): 933-938.

Sveinbjornsdottir, S. (2016). "The clinical symptoms of Parkinson's disease." J Neurochem.

Syed, S. K., H. H. Bui, L. S. Beavers, T. B. Farb, J. Ficorilli, A. K. Chesterfield, M. S. Kuo, K. Bokvist, D. G. Barrett , A. M. Efanov (2012). "Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids." Am J Physiol Endocrinol Metab **303**(12): E1469-1478.

Sylantsev, S., T. P. Jensen, R. A. Ross, D. A. Rusakov (2013). "Cannabinoid-and lysophosphatidylinositol-sensitive receptor GPR55 boosts neurotransmitter release at central synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(13): 5193-5198.

Szabo, B., E. Schlicker (2005). "Effects of cannabinoids on neurotransmission." Handb Exp Pharmacol (168): 327-365.

Tanner, C. M. (1992). "Epidemiology of Parkinson's disease." Neurol Clin **10**(2): 317-329.

Taupin, P. (2006). "Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy." Stem Cell Rev **2**(3): 213-219.

Teismann, P., K. Tieu, D. K. Choi, D. C. Wu, A. Naini, S. Hunot, M. Vila, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski (2003). "Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5473-5478.

Thach, W. T. (1998). "A role for the cerebellum in learning movement coordination." Neurobiol Learn Mem **70**(1-2): 177-188.

Thomas, A., G. L. Baillie, A. M. Phillips, R. K. Razdan, R. A. Ross, R. G. Pertwee (2007). "Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro." Br J Pharmacol **150**(5): 613-623.

Thomas, A., L. A. Stevenson, K. N. Wease, M. R. Price, G. Baillie, R. A. Ross, R. G. Pertwee (2005). "Evidence that the plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabinol is a cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonist." Br J Pharmacol **146**(7): 917-926.

Thomas, E. A., B. F. Cravatt, P. E. Danielson, N. B. Gilula, J. G. Sutcliffe (1997). "Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system." J Neurosci Res **50**(6): 1047-1052.

Tofaris, G. K., R. Layfield, M. G. Spillantini (2001). "alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome." FEBS Lett **509**(1): 22-26.

Tofaris, G. K., M. G. Spillantini (2005). "Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases." Mov Disord **20 Suppl 12**: S37-44.

Toguri, J. T., C. Lehmann, R. B. Laprairie, A. M. Szczesniak, J. Zhou, E. M. Denovan-Wright, M. E. Kelly (2014). "Anti-inflammatory effects of cannabinoid CB2 receptor activation in endotoxin-induced uveitis." Br J Pharmacol **171**(6): 1448-1461.

Tolón, R. M., E. Núñez, M. R. Pazos, C. Benito, A. I. Castillo, J. A. Martínez-Orgado, J. Romero (2009). "The activation of cannabinoid CB2 receptors stimulates in situ and in vitro beta-amyloid removal by human macrophages." Brain Res **1283**: 148-154.

Tsou, K., M. I. Nogueron, S. Muthian, M. C. Sanudo-Pena, C. J. Hillard, D. G. Deutsch, J. M. Walker (1998). "Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry." Neurosci Lett **254**(3): 137-140.

Ueda, N., K. Tsuboi, T. Uyama, T. Ohnishi (2011). "Biosynthesis and degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol." Biofactors **37**(1): 1-7.

Ughratdar, I., M. Samuel, K. Ashkan (2015). "Technological Advances in Deep Brain Stimulation." J Parkinsons Dis **5**(3): 483-496.

Ungerstedt, U. (1968). "6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons." Eur J Pharmacol **5**(1): 107-110.

Urquhart, P., A. Nicolaou, D. F. Woodward (2015). "Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases." Biochim Biophys Acta **1851**(4): 366-376.

Valdeolivas, S., C. Navarrete, I. Cantarero, M. L. Bellido, E. Muñoz , O. Sagredo (2015). "Neuroprotective properties of cannabigerol in Huntington's disease: studies in R6/2 mice and 3-nitropropionate-lesioned mice." Neurotherapeutics **12**(1): 185-199.

Valdeolivas, S., M. R. Pazos, T. Bisogno, F. Piscitelli, F. A. Iannotti, M. Allara, O. Sagredo, V. Di Marzo, J. Fernández-Ruiz (2013). "The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG." Cell Death Dis **4**: e862.

Valenzano, K. J., L. Tafesse, G. Lee, J. E. Harrison, J. M. Boulet, S. L. Gottshall, L. Mark, M. S. Pearson, W. Miller, S. Shan, L. Rabadi, Y. Rotshteyn, S. M. Chaffer, P. I. Turchin, D. A. Elsemore, M. Toth, L. Koetzner , G. T. Whiteside (2005). "Pharmacological and pharmacokinetic characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, GW405833, utilizing rodent models of acute and chronic pain, anxiety, ataxia and catalepsy." Neuropharmacology **48**(5): 658-672.

van der Brug, M. P., A. Singleton, T. Gasser , P. A. Lewis (2015). "Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials." Sci Transl Med **7**(305): 205ps220.

van der Stelt, M. , V. Di Marzo (2003). "The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders." Eur J Pharmacol **480**(1-3): 133-150.

van der Stelt, M. , V. Di Marzo (2005). "Anandamide as an intracellular messenger regulating ion channel activity." Prostaglandins Other Lipid Mediat **77**(1-4): 111-122.

Van Laere, K., C. Casteels, S. Lunsken, K. Goffin, I. D. Grachev, G. Bormans , W. Vandenberghe (2012). "Regional changes in type 1 cannabinoid receptor availability in Parkinson's disease in vivo." Neurobiol Aging **33**(3): 620 e621-628.

Van Sickle, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J. Pittman, K. D. Patel , K. A. Sharkey (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-332.

Velasco, G., I. Galve-Roperh, C. Sánchez, C. Blázquez , M. Guzmán (2004). "Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?" Neuropharmacology **47**(3): 315-323.

Venderova, K., E. Ruzicka, V. Vorisek , P. Visnovsky (2004). "Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms." Mov Disord **19**(9): 1102-1106.

Vijayakumar, D. , J. Jankovic (2016). "Drug-Induced Dyskinesia, Part 1: Treatment of Levodopa-Induced Dyskinesia." Drugs **76**(7): 759-777.

Vila, M. , S. Przedborski (2004). "Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease." Nat Med **10 Suppl**: S58-62.

Villapol, S., A. K. Yaszemski, T. T. Logan, E. Sanchez-Lemus, J. M. Saavedra , A. J. Symes (2012). "Candesartan, an angiotensin II AT(1)-receptor blocker and PPAR-gamma agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice." Neuropsychopharmacology **37**(13): 2817-2829.

Wager-Miller, J., R. Westenbroek , K. Mackie (2002). "Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example." Chem Phys Lipids **121**(1-2): 83-89.

Walker, J. M. , A. G. Hohmann (2005). "Cannabinoid mechanisms of pain suppression." Handb Exp Pharmacol(168): 509-554.

Walsh, S., K. Mnich, K. Mackie, A. M. Gorman, D. P. Finn , E. Dowd (2010). "Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat." Brain Res Bull **81**(6): 543-548.

Walters, A. S., D. McHale, J. I. Sage, W. A. Hening, M. Bergen (1990). "A blinded study of the suppressibility of involuntary movements in Huntington's chorea, tardive dyskinesia, and L-dopa-induced chorea." Clin Neuropharmacol **13**(3): 236-240.

Wang, X., E. K. Michaelis (2010). "Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain." Front Aging Neurosci **2**: 12.

Wang, Y., S. Ma, Q. Wang, W. Hu, D. Wang, X. Li, T. Su, X. Qin, X. Zhang, K. Ma, J. Chen, L. Xiong, F. Cao (2014). "Effects of cannabinoid receptor type 2 on endogenous myocardial regeneration by activating cardiac progenitor cells in mouse infarcted heart." Sci China Life Sci **57**(2): 201-208.

Wei, B. Q., T. S. Mikkelsen, M. K. McKinney, E. S. Lander, B. F. Cravatt (2006). "A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals." J Biol Chem **281**(48): 36569-36578.

Whiting, P. F., R. F. Wolff, S. Deshpande, M. Di Nisio, S. Duffy, A. V. Hernandez, J. C. Keurentjes, S. Lang, K. Misso, S. Ryder, S. Schmidkofer, M. Westwood, J. Kleijnen (2015). "Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis." JAMA **313**(24): 2456-2473.

Wijeyekoon, R., R. A. Barker (2009). "Cell replacement therapy for Parkinson's disease." Biochim Biophys Acta **1792**(7): 688-702.

Xie, H. R., L. S. Hu, G. Y. Li (2010). "SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease." Chin Med J (Engl) **123**(8): 1086-1092.

Yang, H. Y., F. Karoum, C. Felder, H. Badger, T. C. Wang, S. P. Markey (1999). "GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat." J Neurochem **72**(5): 1959-1968.

Yates, M. L., E. L. Barker (2009). "Inactivation and biotransformation of the endogenous cannabinoids anandamide and 2-arachidonoylglycerol." Mol Pharmacol **76**(1): 11-17.

Yi, C. X., M. H. Tschop (2012). "Brain-gut-adipose-tissue communication pathways at a glance." Dis Model Mech **5**(5): 583-587.

Yiangou, Y., P. Facer, P. Durrenberger, I. P. Chessell, A. Naylor, C. Bountra, R. R. Banati, P. Anand (2006). "COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord." BMC Neurol **6**: 12.

Youdim, M. B., W. J. Geldenhuys, C. J. Van der Schyf (2007). "Why should we use multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease?" Parkinsonism Relat Disord **13 Suppl 3**: S281-291.

Yue, M., K. M. Hinkle, P. Davies, E. Trushina, F. C. Fiesel, T. A. Christenson, A. S. Schroeder, L. Zhang, E. Bowles, B. Behrouz, S. J. Lincoln, J. E. Beevers, A. J. Milnerwood, A. Kurti, P. J. McLean, J. D. Fryer, W. Springer, D. W. Dickson, M. J. Farrer, H. L. Melrose (2015). "Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice." Neurobiology of Disease **78**: 172-195.

Zelasko, S., W. R. Arnold, A. Das (2015). "Endocannabinoid metabolism by cytochrome P450 monooxygenases." Prostaglandins Other Lipid Mediat **116-117**: 112-123.

Zhang, H. Y., M. Gao, Q. R. Liu, G. H. Bi, X. Li, H. J. Yang, E. L. Gardner, J. Wu, Z. X. Xi (2014). "Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(46): E5007-5015.

Zhang, Y. F., X. L. Zou, J. Wu, X. Q. Yu , X. Yang (2015). "Rosiglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)-gamma Agonist, Attenuates Inflammation Via NF-kappaB Inhibition in Lipopolysaccharide-Induced Peritonitis." *Inflammation* **38**(6): 2105-2115.

Zheng, G., S. Hong, J. M. Hayes , J. W. Wiley (2015). "Chronic stress and peripheral pain: Evidence for distinct, region-specific changes in visceral and somatosensory pain regulatory pathways." *Exp Neurol* **273**: 301-311.

Zoppi, S., B. G. Pérez Nievas, J. L. Madrigal, J. Manzanares, J. C. Leza , B. García-Bueno (2011). "Regulatory role of cannabinoid receptor 1 in stress-induced excitotoxicity and neuroinflammation." *Neuropsychopharmacology* **36**(4): 805-818.

Zoratti, C., D. Kipmen-Korgun, K. Osibow, R. Malli , W. F. Graier (2003). "Anandamide initiates Ca(2+) signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells." *Br J Pharmacol* **140**(8): 1351-1362.

Zuccato, C. , E. Cattaneo (2009). "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases." *Nat Rev Neurol* **5**(6): 311-322.

Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius , E. D. Hogestatt (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." *Nature* **400**(6743): 452-457.

ANEXO

Themed Issue: Cannabinoids in Biology and Medicine, Part I

RESEARCH PAPER

Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease

C García^{1,2,3}, C Palomo-Garo^{1,2,3}, M García-Arencibia^{1,2}, JA Ramos^{1,2,3}, RG Pertwee⁴ and J Fernández-Ruiz^{1,2,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, ³Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain, and ⁴School of Medical Sciences, Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, UK

BACKGROUND AND PURPOSE

Previous findings have indicated that a cannabinoid, such as Δ^9 -THCV, which has antioxidant properties and the ability to activate CB₂ receptors but to block CB₁, might be a promising therapy for alleviating symptoms and delaying neurodegeneration in Parkinson's disease (PD).

EXPERIMENTAL APPROACH

The ability of Δ^9 -THCV to reduce motor inhibition and provide neuroprotection was investigated in rats lesioned with 6-hydroxydopamine and in mice lesioned with lipopolysaccharide (LPS).

KEY RESULTS

Acute administration of Δ^9 -THCV attenuated the motor inhibition caused by 6-hydroxydopamine, presumably through changes in glutamatergic transmission. Moreover, chronic administration of Δ^9 -THCV attenuated the loss of tyrosine hydroxylase-positive neurones caused by 6-hydroxydopamine in the substantia nigra, through an effect related to its antioxidant properties (it was reproduced by cannabidiol-enriched botanical extract). In addition, CB₂ receptor-deficient mice responded to 6-hydroxydopamine in a similar manner to wild-type animals, and CB₂ receptors were poorly up-regulated in the rat substantia nigra in response to 6-hydroxydopamine. By contrast, the substantia nigra of mice that had been injected with LPS exhibited a greater up-regulation of CB₂ receptors. In these animals, Δ^9 -THCV also caused preservation of tyrosine hydroxylase-positive neurones. This effect probably involved CB₂ receptors as it was also elicited by the selective CB₂ receptor agonist, HU-308, and CB₂ receptor-deficient mice were more vulnerable to LPS lesions.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Given its antioxidant properties and its ability to activate CB₂ but to block CB₁ receptors, Δ^9 -THCV has a promising pharmacological profile for delaying disease progression in PD and also for ameliorating parkinsonian symptoms.

LINKED ARTICLES

This article is part of a themed issue on Cannabinoids in Biology and Medicine. To view the other articles in this issue visit <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-7>

Abbreviations

CBD, cannabidiol; CP-55940, 2-[(1R,2R,5R)-5-hydroxy-2-(3-hydroxypropyl) cyclohexyl]-5-(2-methyloctan-2-yl)phenol; HU-308, [(1R,2R,5R)-2-[2,6-dimethoxy-4-(2-methyloctan-2-yl)phenyl]-7,7-dimethyl-4-bicyclo[3.1.1]hept-3-enyl] methanol; PD, Parkinson's disease; Δ^9 -THC, Δ^9 -tetrahydrocannabinol; Δ^9 -THCV, Δ^9 -tetrahydrocannabivarin

Correspondence

Javier Fernández-Ruiz, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040-Madrid, Spain. E-mail: jjfr@med.ucm.es

Keywords

Δ^9 -THCV; cannabinoid receptors; Parkinson's disease; 6-hydroxydopamine-lesioned rats; LPS-lesioned mice; neuroprotection

Received

17 November 2010

Revised

21 December 2010

Accepted

18 January 2011

Introduction

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder; its aetiology is associated with environmental insults, genetic susceptibility or interactions between both causes (Thomas and Beal, 2007). The major clinical symptoms in PD are tremor, bradykinesia, postural instability and rigidity, symptoms that result from the severe dopaminergic denervation of the striatum caused by the progressive death of dopaminergic neurones of the substantia nigra pars compacta (Nagatsu and Sawada, 2007). Major symptoms in PD (e.g. bradykinesia) can be attenuated with dopaminergic replacement therapy (Thomas and Beal, 2007). However, this therapy does not work for all PD patients, and when used for more than 5–10 years, it provokes an irreversible dyskinetic state (Pezzoli and Zini, 2010). Therefore, the search for novel symptomatic therapies, as well as for treatments effective in delaying the progression of nigrostriatal damage in PD, is still the major challenge in PD therapy.

Cannabinoid-based compounds have recently been proposed as promising therapies in PD (García-Arencibia *et al.*, 2009). Thus, the blockade of CB₁ receptors, which are highly abundant in basal ganglia structures, may be effective in reducing the motor inhibition typical of PD patients (Fernández-Espejo *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Kelsey *et al.*, 2009), as well as in enhancing the therapeutic effect of moderate doses of levodopa, which are less pro-dyskinetic (Kelsey *et al.*, 2009). Both effects are in accordance with the overactivity of the cannabinoid system observed in PD patients and in animal models of this disease (Di Marzo *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2000; Lastres-Becker *et al.*, 2001; Gubellini *et al.*, 2002; Pisani *et al.*, 2005). In addition, CB₁ receptor-deficient mice also showed less severe dyskinesias, when lesioned with 6-hydroxydopamine and treated with levodopa, compared with wild-type animals (Pérez-Rial *et al.*, 2010). However, the efficacy of CB₁ receptor blockade was restricted to specific circumstances, that is the use of low doses (Fernández-Espejo *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Kelsey *et al.*, 2009) and very extensive nigral damage (Fernández-Espejo *et al.*, 2005), conditions that were not reproduced in the only clinical trial conducted so far with CB₁ receptor blockers, which included a population of patients that were all good responders to levodopa (Mesnage *et al.*, 2004). Therefore, this potential therapeutic strategy merits further clinical investigation, this time with PD patients that respond poorly to levodopa. On the other hand, other studies have reported that compounds that directly or indirectly activate rather than block CB₁ receptors also alleviate the symptoms associated with PD (Ferrer *et al.*, 2003; Segovia *et al.*, 2003; Fernández-Espejo *et al.*, 2004), thus stressing the complexity of the effects of cannabinoids in PD.

Some cannabinoids have been reported to protect nigral neurones from death caused by different cytotoxic stimuli in various experimental models of PD (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007; Jiménez-Del-Río *et al.*, 2008). These include the phytocannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD) (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007), the synthetic CB₁/CB₂ receptor agonist CP55 940 (Jiménez-Del-Río *et al.*, 2008) and the anandamide analogue AM404 (García-Arencibia *et al.*, 2007). *A priori* these compounds

acted through antioxidant mechanisms that seem to be independent of CB₁ or CB₂ receptors, although selective CB₂ receptor agonists also showed efficacy in MPTP-lesioned mice (Price *et al.*, 2009) but not in 6-hydroxydopamine-lesioned rats (García-Arencibia *et al.*, 2007). It is also noteworthy that CB₁ receptor-deficient mice display an increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesions (Pérez-Rial *et al.*, 2010). However, selective CB₁ receptor agonists do not seem to protect against 6-hydroxydopamine-induced damage (García-Arencibia *et al.*, 2007), and they may even aggravate major parkinsonian symptoms, given the hypokinetic effects associated with the activation of the CB₁ receptor (García-Arencibia *et al.*, 2009).

Therefore, these previous data provide good evidence that a cannabinoid having antioxidant properties and the ability to activate CB₂ receptors but to block CB₁ receptors, might serve to alleviate parkinsonian symptoms and to arrest/delay neurodegeneration in PD. Δ^9 -THC and CBD are two phytocannabinoids that display cannabinoid receptor-independent antioxidant properties in PD (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007). However, Δ^9 -THC is an agonist of CB₁ receptors and acutely aggravates motor inhibition, and CBD has negligible activity at both CB₁ and CB₂ receptors. In addition, although rimonabant may be efficacious as a symptom-relieving agent (Fernández-Espejo *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Kelsey *et al.*, 2009), it does not appear to have neuroprotective effects in PD. Indeed, enhanced damage has been reported after genetic ablation of CB₁ receptors and lesion with 6-hydroxydopamine (Pérez-Rial *et al.*, 2010). However, the phytocannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) has a pharmacological profile that seems to be particularly appropriate for PD; it is an antioxidant and appears to act as a CB₁ receptor antagonist (when used at doses lower than 3 mg·kg⁻¹) but is a potent CB₂ receptor agonist. *In vitro*, it has been shown to displace [³H]-CP55940 from human CB₁ and CB₂ receptors, antagonize CP55940-induced stimulation of [³⁵S]-GTP γ S binding to human CB₁ receptors, inhibit forskolin-induced stimulation of cAMP production in human CB₂-expressing Chinese hamster ovary cells and stimulate [³⁵S]-GTP γ S binding both to human CB₂ receptors and to mouse spleen membranes, all at submicromolar concentrations (Thomas *et al.*, 2005; Pertwee *et al.*, 2007; Bolognini *et al.*, 2010). *In vivo*, it has been shown to antagonize certain CB₁ receptor-mediated behavioural effects of Δ^9 -THC in mice (Pertwee *et al.*, 2007) and decrease carrageenan-induced mouse paw oedema in a manner that can be antagonized by the CB₂ antagonist, SR144528, but not by the CB₁ antagonist, rimonabant (Bolognini *et al.*, 2010).

The aim of the present study was to demonstrate that Δ^9 -THCV can alleviate the symptoms associated with PD by blocking CB₁ receptors at low doses (Thomas *et al.*, 2005) and also induce neuroprotection due to its antioxidant properties and/or CB₂ agonist activity. We used rats subjected to i.c.v. injection of 6-hydroxydopamine as a model to screen for evidence of amelioration and neuroprotection (Rodríguez Díaz *et al.*, 2001; see details in González *et al.*, 2006; García-Arencibia *et al.*, 2008). In an initial experiment, we compared the ability of Δ^9 -THCV to improve the motor inhibition produced by 6-hydroxydopamine in these animals with that of rimonabant, a compound that has already been shown to have beneficial effects in this experimental model (González

et al., 2006). Concentrations of neurotransmitters in the basal ganglia of these animals were determined, in particular those of glutamate as this neurotransmitter has been found to be involved in the anti-parkinsonian effect that follows the blockade of CB₁ receptors (García-Arencibia *et al.*, 2008). In a second experiment, Δ^9 -THCV was administered to 6-hydroxydopamine-lesioned animals for a period of 14 days and its ability to protect nigral neurones from 6-hydroxydopamine insult was evaluated by tyrosine hydroxylase immunostaining, a parameter that, although does not completely reflect neurodegeneration/neuroprotection *per se*, is frequently used for this purpose. OX-42 immunostaining (microglial activation) was also determined. Given that CB₂ receptor agonists failed to provide neuroprotection in 6-hydroxydopamine-lesioned rats (García-Arencibia *et al.*, 2007), effects of Δ^9 -THCV in these rats should be assigned *a priori* only to its cannabinoid receptor-independent antioxidant properties. We explored this hypothesis further: (i) by comparing the effects of Δ^9 -THCV with those produced by CBD, which showed positive effects in previous studies (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007); (ii) by determining the presence of CB₂ receptors in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats; and (iii) by measuring the response to this neurotoxin in CB₂ receptor-deficient mice. As our data confirmed that the neuroprotective effects of Δ^9 -THCV in 6-hydroxydopamine-lesioned rats do not appear to be mediated by CB₂ receptors, we conducted additional experiments using mice intrastrially injected with LPS, a model of PD with a higher inflammatory profile and in which up-regulation of CB₂ receptors in response to damage was much more intense. HU-308, a selective CB₂ receptor agonist, was used as a positive control. The response of CB₂ receptor-deficient mice to LPS was also investigated.

Methods

6-Hydroxydopamine or LPS lesions and pharmacological treatments

Animals. Male Sprague-Dawley rats or CB₂^{-/-} mice and their respective wild-type littermates (bred in our animal facilities from mice donated by Dr Nancy Buckley, California State Polytechnic University, Pomona, CA, USA; see Buckley *et al.*, 2000; Buckley, 2008) were housed in a room with a controlled photoperiod (0600–1800 h light) and temperature (22 ± 1°C). They had free access to standard food and water and were used at adult age (>2 months old and weighing around 350 g at the onset of experiments, for rats; and 3–4 months old; 25–30 g weight, for mice) for experimental purposes. All experiments were conducted according to Spanish and European guidelines (directive 86/609/EEC). In the case of mice, their genetic profile (CB₂^{+/+}, CB₂^{+/-} and CB₂^{-/-}) was determined by PCR analysis, as described by Buckley *et al.* (2000), using DNA extracted from a piece of tail taken from each mouse. Only homozygous mice (CB₂^{+/+} or CB₂^{-/-}) were used in these experiments.

Intracerebroventricular or unilateral injection of 6-hydroxydopamine or LPS. Rats were subjected to an i.c.v.

injection of 6-hydroxydopamine following the procedure previously described by Rodríguez Díaz *et al.*, (2001). This model has been validated in our laboratory, and the details regarding the dose–response curves and the time course of the effects of 6-hydroxydopamine, as well as the behavioural characterization of motor deficits, and the histopathological and neurochemical evaluation of the animal brains have been described elsewhere (González *et al.*, 2006). Rats were anaesthetized (ketamine 40 mg·kg⁻¹ + xylazine 4 mg·kg⁻¹, i.p.) 30 min after pretreatment with desipramine (25 mg·kg⁻¹, i.p.), and then 6-hydroxydopamine free base (200 µg in a volume of 5 µL of saline containing 0.05% ascorbate to avoid oxidation) or saline (for control rats) was injected stereotactically into the third ventricle (coordinates from bregma: –2 mm AP, 0 mm ML and 8 mm DV, according to Paxinos and Watson, 1986). The solution was injected slowly (0.5 µL·30 s⁻¹), and the needle was left in place for 5 min before being slowly withdrawn. This avoids generating reflux and a rapid increase in intracranial pressure. After the application of 6-hydroxydopamine or saline, animals were used for pharmacological treatments as described in the following section. We also induced lesions with 6-hydroxydopamine using unilateral administration, the advantage of which is that contralateral structures serve as controls for the different analyses. This procedure was used in rats to seek out a possible up-regulation of CB₂ receptors in the lesioned substantia nigra and in mice to evaluate possible differences in the response to 6-hydroxydopamine between CB₂-deficient and wild-type animals. Rats (pretreated with 25 mg·kg⁻¹ desipramine, i.p., 30 min before) received injections of 6-hydroxydopamine free base (8 µg in a volume of 2 µL of saline containing 0.05% ascorbate to avoid oxidation) stereotactically into the medial forebrain bundle (coordinates from bregma: –2.5 mm AP, –1.8 mm ML and –8.9 mm DV; Paxinos and Watson, 1986). Two weeks post lesion, animals were transcardially perfused with saline followed by fresh 4% paraformaldehyde [in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS)], and their brains were collected and post-fixed overnight at 4°C, cryoprotected with 30% sucrose in PBS and then frozen and stored at –80°C for immunohistochemical analysis of CB₂ receptors. In the case of mice (also pretreated with 25 mg·kg⁻¹ desipramine, i.p., 30 min before), 6-hydroxydopamine (2 µL at a concentration of 2 µg·µL⁻¹ saline in 0.2% ascorbate) was injected into the right striatum at a rate of 0.5 µL·min⁻¹, using the following coordinates: +0.4 mm AP, ±1.8 mm ML and –3.5 mm DV, as described in Alvarez-Fischer *et al.* (2008). These animals were killed by rapid and careful decapitation 1 week after lesioning, and their brains were rapidly removed and frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice and stored at –80°C for subsequent immunohistochemical analysis of the substantia nigra. On the other hand, other groups of mice received unilateral injections of *S. Minnesota* LPS (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) into two points of the right striatum following the procedure developed by Hunter *et al.* (2009). We used the following stereotaxic coordinates from bregma: +1.18 mm AP, –1.5 mm ML and –3.5 mm DV, as well as –0.34 mm AP, –2.5 mm ML and –3.2 mm DV (see details in Hunter *et al.*, 2009). At each intrastriatal coordinate, 5 µg of LPS in a volume of 1 µL of saline was injected by using the same procedure as for 6-hydroxydopamine. Control animals were

sham-operated and injected with 1 μL of saline using the same coordinates. This procedure leads to a loss of dopaminergic neurones caused predominantly by LPS-induced inflammatory events. After the application of LPS or saline, animals were subjected to pharmacological treatments as described in the following section, although a separate group remained untreated for 2 weeks and were perfused with paraformaldehyde following the same procedure as described above. Lastly, LPS was also administered to CB_2 -deficient and wild-type mice to evaluate possible differences in the response to LPS, following the same procedure described above.

Pharmacological treatments. Our initial experiment was directed at establishing whether Δ^9 -THCV, at a dose of $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (based on previous dose-response analysis conducted in our laboratory; data not shown) can behave *in vivo* as a CB_1 receptor antagonist in rats since it has previously been validated as a CB_1 receptor antagonist *in vivo* only in mice (Pertwee *et al.*, 2007; Bolognini *et al.*, 2010). We investigated its ability to attenuate two effects induced by the cannabinoid agonist, CP-55,940: motor inhibition and antinociception in a model of acute pain, both effects that are thought to be mediated by CB_1 receptors. To this end, naïve rats were administered CP55,940 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.; purchased from Tocris Bioscience, Biogen Científica, Madrid, Spain) and/or Δ^9 -THCV (kindly provided by GW Pharmaceuticals Ltd, Cambridgeshire, UK) and effects on their motor behaviour were determined in a computer-aided actimeter, followed by the hot-plate test to determine their nociceptive sensitivity. In a subsequent experiment, Δ^9 -THCV was administered i.p. in a single dose ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) to 6-hydroxydopamine-lesioned animals 14 days after the lesion. Separate groups of animals received vehicle (Tween 80 : saline, 1:16) or rimonabant ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; kindly provided by Sanofi-Aventis, Montpellier, France), also i.p. and at the same dose employed in our previous studies (González *et al.*, 2006; García-Arencibia *et al.*, 2008). Ten minutes later, the behaviours of vehicle-, Δ^9 -THCV- or rimonabant-injected 6-hydroxydopamine-lesioned animals and sham-operated controls were assessed in a computer-aided actimeter for a period of 10 min, at the end of which the animals were killed by rapid and careful decapitation. Their brains were rapidly removed and frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice and stored at -80°C for analysis of neurotransmitters in basal ganglia. In the next experiment, Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) was administered i.p. to 6-hydroxydopamine-lesioned animals for a period of 14 days (one injection per day) starting shortly (approximately 16 h) after the lesion. Separate groups of animals received vehicle (Tween 80 : saline, 1:16) or CBD-enriched botanical extract (also provided by GW Pharmaceuticals Ltd, Cambridgeshire, UK) that contains 64.8% CBD, 2.3% Δ^9 -THC, 1.1% cannabigerol, 3.0% cannabichromene and 1.5% other phytocannabinoids. It was also administered i.p., at a dose of $4.63 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (equivalent to $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of pure CBD, the same dose used in previous studies; Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007), and was used in this investigation as a positive control. Two hours after the final injection, the 6-hydroxydopamine-lesioned animals injected with vehicle, Δ^9 -THCV or CBD-enriched botanical extract and sham-operated controls were killed by rapid and careful decapitation. Their brains were rapidly removed and

frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice and stored at -80°C for subsequent immunohistochemical analysis of the substantia nigra. Lastly, Δ^9 -THCV ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or HU-308 ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; purchased from Tocris Bioscience, Biogen Científica) were administered i.p. to LPS-lesioned mice for a period of 14 days (one injection per day) starting shortly (approximately 16 h) after the lesion. Separate groups of animals received vehicle (Tween 80 : saline, 1:16). Two hours after the final injection, the LPS-lesioned animals injected with vehicle, Δ^9 -THCV or HU-308 and sham-operated controls were killed by transcardial perfusion with 4% paraformaldehyde as described above. Their brains were collected, post-fixed, cryoprotected and subsequently used for immunohistochemical analysis of the substantia nigra.

Behavioural analysis

Computer-aided actimeter. Motor activity was analysed in a computer-aided actimeter (Actitrack, Panlab, Barcelona, Spain). This apparatus consisted of a $45 \times 45 \text{ cm}$ area, with infrared beams all around, spaced 2.5 cm, coupled to a computerized control unit that analyses the following parameters: (i) distance run in the actimeter (ambulation); (ii) mean velocity developed during this running; and (iii) time spent in fast ($>5 \text{ cm s}^{-1}$) and slow ($<5 \text{ cm s}^{-1}$) movements. Animals stayed in the actimeter for a period of 10 min, but measurements were only recorded during the final 5 min (first 5 min was used only for animal acclimatization).

Hot-plate test. Rats were placed on a hot-plate maintained at 52°C , and the latency to exhibit the first sign of pain (i.e. licking the hind paws or jumping) was measured for each animal. Animals not responding were removed after 30 s (cut-off time to avoid tissue damage).

Determination of dopamine and glutamate concentrations

Dissection procedure. Coronal slices (around $500 \mu\text{m}$ thick) were obtained manually from brains at the level containing the caudate-putamen, globus pallidus and substantia nigra. Subsequently, these structures were dissected and homogenized in 20–40 vol of cold 150 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and the dopamine and glutamate content of each homogenate was analysed. An aliquot of each homogenate was used to determine the protein concentration (Lowry *et al.*, 1951).

Determination of dopamine content. Dopamine content was determined using HPLC with electrochemical detection (Lastres-Becker *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006). Briefly, homogenates were diluted in ice-cold 0.2 N perchloric acid containing 0.2 mM sodium disulphite and 0.45 mM EDTA, and dihydroxybenzylamine ($20 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$) was added as an internal standard. The diluted homogenates were then centrifuged, and the supernatants were injected into the HPLC system. This system consisted of a Spectra-Physics 8810 pump and an RP-18 column (Tracer Excel 120 ODSB; 150 mm, 4.6 mm, $5 \mu\text{m}$ particle size; Teknokroma, Barcelona, Spain). The mobile phase, previously filtered and degassed, was a solution of 100 mM citric acid, 100 mM sodium acetate, 1.2 mM heptane sulphonate, 1 mM EDTA and 7% methanol

(pH 3.9), and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The effluent was monitored with a coulochemical detector (Coulochem III, ESA) using a procedure of oxidation/reduction (conditioning cell: +360 mV; analytical cell #1: +50 mV; analytical cell #2: -340 mV). The signal was recorded on a Spectra-Physics 4290 integrator from the analytical cell #2, with a sensitivity of 50 nA (10 pg per sample). Dopamine levels were calculated from areas under the peaks using the comparison with the internal standard area. Values are expressed as ng·mg⁻¹ of protein.

Determination of glutamate content. Homogenates were used for the analysis of glutamate content using a commercial Glutamate Assay Kit (#K629-100, BioVision, Mountain View, CA, USA) and following the instructions provided by the manufacturer. Values were calculated as nmol·mg⁻¹ of protein and expressed as % of controls.

Immunohistochemical procedures

Coronal sections (20 μ m thick) were obtained from the previously frozen brains with a cryostat and collected on gelatin-coated slides. Sections were fixed in fresh 4% paraformaldehyde prepared in 0.1 M PBS, pH 7.4. After being washed in PBS, sections were incubated overnight at room temperature with the primary antibodies: (i) monoclonal anti-tyrosine hydroxylase (Chemicon-Millipore, Temecula, CA, USA) used at 1:500; and (ii) monoclonal anti-rat CD11b clon OX-42 (Serotec, Bionova Científica, Madrid, Spain) used at 1:50. Next, sections were incubated with the secondary antibody, biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Elite, Burlingame, CA, USA), used at 1:200, followed by streptavidin incubation. We used Alexa Fluor-488 conjugated streptavidin (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for tyrosine hydroxylase immunostaining, and Alexa Fluor-546 conjugated streptavidin (1:200, Molecular Probes) for OX-42 immunostaining. Sections were then stained with 45 μ M Hoechst 33342 and the slides were coverslipped with Vectashield mounting medium (Vector Elite, Burlingame, CA, USA). Negative control sections were obtained using the same protocol with omission of the primary antibody. All sections for each immunohistochemical procedure were processed at the same time and under the same conditions. In the case of tyrosine hydroxylase immunostaining in mouse sections, we used Mouse on Mouse Immunodetection Kit (Vector Elite), following the instructions provided by the manufacturer, to avoid secondary antibody cross-reaction. A Nikon Eclipse 90i microscope and a Nikon DXM 1200F camera were used for slide observation and photography. The magnitude of tyrosine hydroxylase or OX-42 immunostaining in the substantia nigra (both sides) for each animal was determined with NIH Image Processing and Analysis software (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA) using three to six randomly selected sections, separated by 200 μ m, and observed with a 5 \times objective. In all sections, the same area of substantia nigra pars compacta was analysed. Background signal was determined for each section in a small area near the one being examined. Analyses were always conducted by experimenters who were blinded to all animal characteristics.

Immunohistochemical analysis of CB₂ receptor (also in those immunostainings for tyrosine hydroxylase carried out in LPS-lesioned mice) was performed in paraformaldehyde-

perfused brains instead of frozen brain sections. Fixed brains were sliced in a cryostat (30 μ m thick) and collected on gelatine-coated slides. Sections were incubated overnight at room temperature with polyclonal anti-CB₂ receptor (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Next, sections were incubated with an Alexa-Fluor 594 chicken anti-goat secondary antibody conjugate (1:200; Molecular Probes). A Nikon Eclipse 90i microscope and a Nikon DXM 1200F camera were used for slide observation and photography.

Data analysis

Data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test, using Graph-Pad software (La Jolla, CA, USA) (version 4.0).

Results

Antagonism by Δ^9 -THCV of hypokinetic and analgesic effects of CP55,940

Figure 1 shows data obtained in experiments directed at establishing whether Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹) behaves as a CB₁ receptor antagonist *in vivo* in rats, as previously demonstrated in studies conducted in mice (Pertwee *et al.*, 2007; Bolognini *et al.*, 2010). As expected, the potent cannabinoid receptor agonist CP55,940 reduced ambulation in the actitrack [$F(3,21) = 7.983$, $P < 0.005$; Figure 1], altered other motor parameters in the same direction (data not shown) and increased the latency of the response by animals to a noxious stimulus in the hot-plate test [$F(3,22) = 13.84$, $P < 0.001$; Figure 1], two effects that are thought to be induced by the activation of CB₁ receptors. The administration of Δ^9 -THCV did not produce any effect by itself, but it partially attenuated the effects of CP55,940 in both assays (Figure 1), thus supporting the notion that Δ^9 -THCV also behaves as a CB₁ receptor antagonist in rats at the dose of 2 mg·kg⁻¹.

Effect of Δ^9 -THCV on motor inhibition and dopamine and glutamate anomalies in 6-hydroxydopamine-lesioned rats

Figures 2 and 3 show the effects of an acute injection of Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹) or rimonabant (0.1 mg·kg⁻¹) on motor inhibition (lower ambulation, mean velocity and time spent in fast movements and increased time spent in slow movements) and dopamine and glutamate anomalies caused by lesioning with 6-hydroxydopamine (i.c.v.). In this model, striatal dopamine content is significantly reduced (fivefold) 14 days post lesion, although this is accompanied by small motor anomalies, in accordance with human cases of parkinsonism where the appearance of motor symptoms occurs only after a loss of dopaminergic neurones greater than 50% (Nagatsu and Sawada, 2007). This was also observed in the present study (see Figures 2 and 3). Our behavioural data indicated that both Δ^9 -THCV and rimonabant were equally effective in enhancing ambulation [$F(3,18) = 4.14$, $P < 0.05$], mean velocity [$F(3,18) = 4.22$, $P < 0.05$] and, to a lesser extent, time spent doing fast movements [$F(3,19) = 1.992$, $P = 0.156$], reaching in all cases values similar to those exhibited by sham-operated animals (Figure 2). In addition, Δ^9 -THCV and

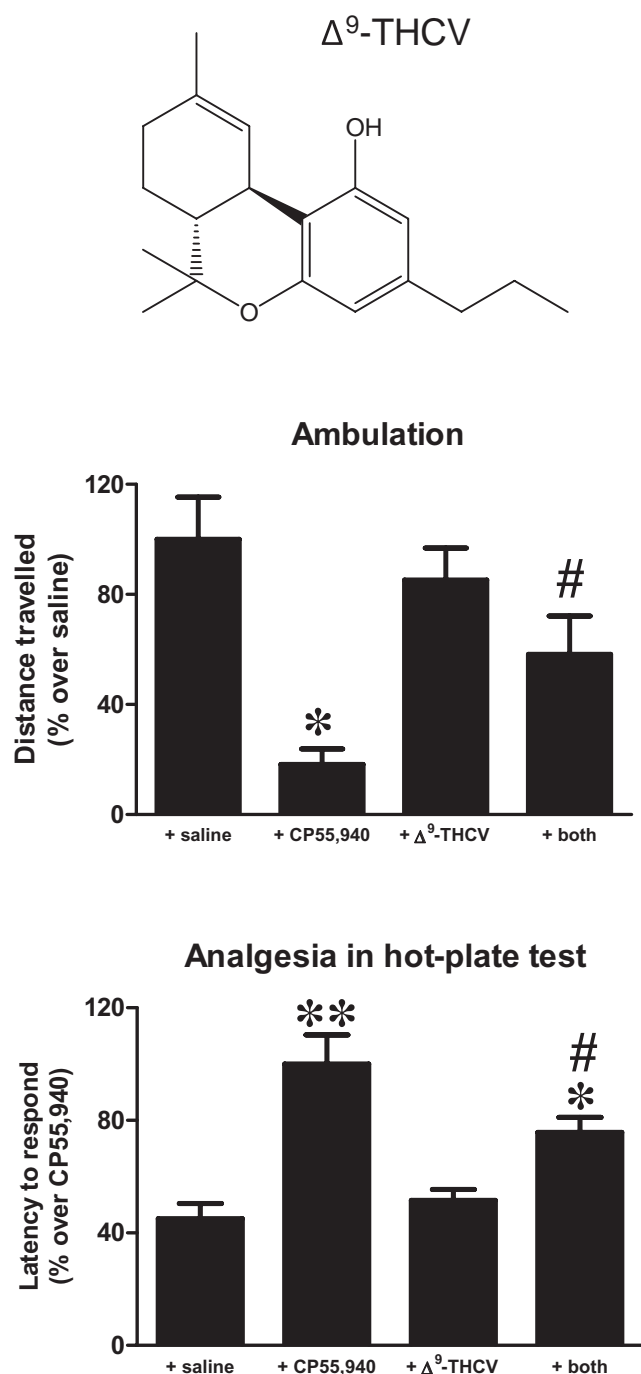


Figure 1

Effect of a single i.p. injection of Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹; its structure is shown in the top panel) on CP55,940-induced motor inhibition and analgesia (measured in the hot-plate test) in naïve rats. Values were normalized versus the group having the maximal response and are expressed as means \pm SEM (n = 5–6 rats per group). Data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test (* P < 0.05, ** P < 0.005 vs. control and Δ^9 -THCV-treated animals; # P < 0.05 vs. CP55,940-treated animals).

rimonabant also reduced the large amount of time that these animals spent displaying slow movements [$F(3,21)$ = 3.037, P < 0.05; Figure 2].

The effect of Δ^9 -THCV on behaviour was not associated with an increase in dopamine levels in the striatum, which, as mentioned above, is significantly reduced by lesioning with 6-hydroxydopamine [$F(2,16)$ = 8.30, P < 0.005; Figure 3]. However, it was paralleled by signs of an increase in the glutamate content of the striatum, although this effect did not reach statistical significance [$F(2,17)$ = 2.786, P = 0.094; Figure 3], as well as by a significant reduction of this chemical in the substantia nigra [$F(2,17)$ = 3.991, P < 0.05; Figure 3]. No changes in glutamate levels were found in the globus pallidus (Figure 3). In all three structures, values of glutamate levels in control animals were as expected (striatum: 42.1 \pm 5.2 nmol·mg⁻¹ protein; globus pallidus: 50.1 \pm 5.9 nmol·mg⁻¹ protein; and substantia nigra: 36.8 \pm 2.6 nmol·mg⁻¹ protein) from previous findings (González *et al.*, 2006). Values were normalized for graphical presentation (see Figure 3).

Effect of Δ^9 -THCV on tyrosine hydroxylase immunostaining in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats or LPS-lesioned mice

Figure 4 shows the effects of chronic treatment with Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹; 14 days), or with a CBD-enriched botanical extract (equivalent to 3 mg·kg⁻¹ of pure CBD; 14 days), on the damage in nigral neurones caused by 6-hydroxydopamine (i.c.v.). These data indicate that the loss of nigrostriatal dopaminergic neurones, determined by tyrosine hydroxylase immunostaining in the substantia nigra, was reduced after chronic administration of Δ^9 -THCV [$F(3,18)$ = 4.869, P < 0.05; Figure 4]. Δ^9 -THCV also attenuated the enhanced microglial activation caused by 6-hydroxydopamine, as measured by OX-42 immunostaining in the substantia nigra [$F(3,18)$ = 31.63, P < 0.0001; Figure 4]. Both effects were also seen, to an even greater extent, with CBD-enriched botanical extract (Figure 4), in accordance with previous data obtained with pure CBD (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007). This finding possibly indicates that the neuroprotective effects of Δ^9 -THCV in 6-hydroxydopamine-lesioned rats are due more to its antioxidant properties than to its ability to activate CB₂ receptors. Previous studies have indicated that these receptors do not appear to play an important role in nigrostriatal lesions caused by 6-hydroxydopamine (García-Arencibia *et al.*, 2007). We obtained further evidence for this by showing that immunostaining for CB₂ receptors in the substantia nigra of the lesioned side was very weak (only a few cells were labelled with the anti-CB₂ antibody; see Figure 5) and so not much different from that seen in the contralateral non-lesioned side of each animal (Figure 5). In addition, lesioning CB₂ receptor-deficient mice with 6-hydroxydopamine led to a loss of tyrosine hydroxylase immunostaining in the substantia nigra that was of the same magnitude (approximately 50%) as that observed in wild-type animals (Figure 5). For these two last experiments, we used a unilateral lesion with 6-hydroxydopamine as this is much more appropriate for evaluating the degree of response against this neurotoxin, since this procedure allows the contralateral structures to serve as controls for the different

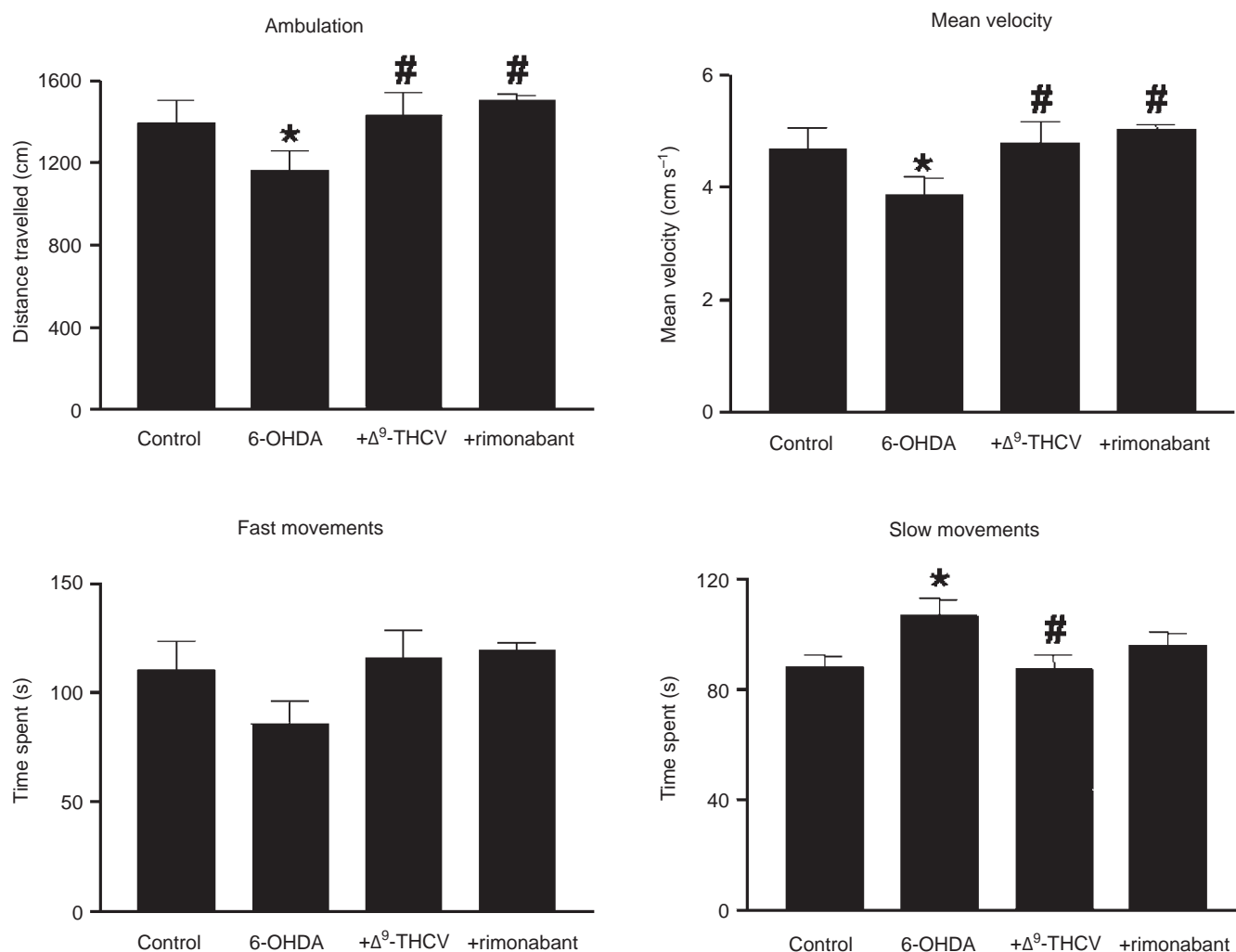


Figure 2

Motor parameters measured using a computer-aided actimeter. Rats were injected i.c.v. with 6-hydroxydopamine or saline (control rats) and subjected to a single i.p. injection of Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹), rimonabant (0.1 mg·kg⁻¹) or vehicle two weeks later. Values are means \pm SEM ($n = 5$ –6 rats per group), and the data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test (* $P < 0.05$ vs. controls; # $P < 0.05$ vs. 6-hydroxydopamine-lesioned animals).

analyses (up-regulation of CB₂ receptors and loss of tyrosine hydroxylase immunostaining).

Since 6-hydroxydopamine induces effects that do not appear to be counteracted by CB₂ receptor activation, we conducted additional experiments using a model of PD in which CB₂ receptors are expected to have a greater protective role. More specifically, mice were administered LPS by a unilateral intrastriatal injection, and it was found that immunostaining for CB₂ receptors in the lesioned substantia nigra was more intense than in the contralateral non-lesioned structure (Figure 6). These were presumably CB₂ receptors located in microglial cells labelled with IBA-1 (data not shown). These animals showed a significant reduction in tyrosine hydroxylase immunoreactivity [$F(3,17) = 4.73$, $P < 0.05$; see Figure 6] that reached approximately 32%, in line with data published by Hunter *et al.* (2009) who used different amounts of LPS. The administration of Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹, i.p.) to LPS-lesioned animals was associated with

the preservation of tyrosine hydroxylase-positive neurones, as indicated by immunostaining for this enzyme (Figure 6). The same effect was also observed with the selective CB₂ receptor agonist HU-308 (Figure 6), thus supporting the involvement of CB₂ receptors in this PD model. This was further supported by the finding that CB₂ receptor-deficient mice were more vulnerable to LPS-induced lesions than wild-type animals (Figure 6).

Discussion

Several cannabinoids have been found to display signs of therapeutic efficacy in animal models of PD, although their effects were limited to the alleviation of specific motor symptoms [e.g. rimonabant for akinesia (Fernández-Espejo *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Kelsey *et al.*, 2009) or levodopa-induced dyskinesia (for review, see García-Arencibia

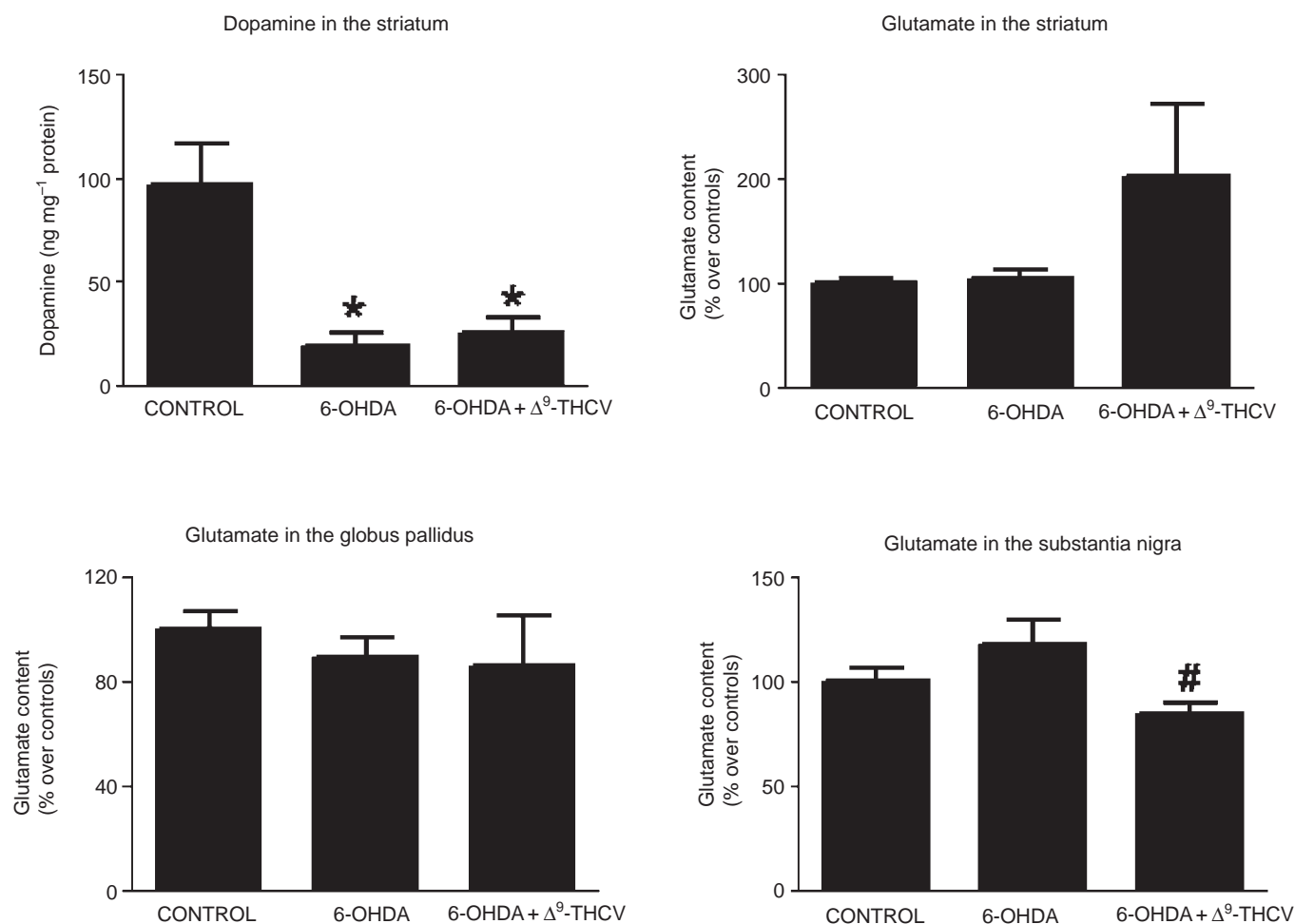


Figure 3

Dopamine content in the striatum and glutamate concentrations in different basal ganglia structures of rats injected i.c.v. with 6-hydroxydopamine or saline (control rats) and subjected to a single i.p. injection of Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹) or vehicle 2 weeks later. Values are means \pm SEM ($n = 5$ –6 rats per group), and the data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test (* $P < 0.005$ vs. controls; # $P < 0.05$ vs. 6-hydroxydopamine-lesioned animals).

et al., 2009), CB₁ receptor agonists for tremor (Sañudo-Peña *et al.*, 1999) and antioxidant cannabinoids (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007; Jiménez-Del-Río *et al.*, 2008) or CB₂ receptor agonists (Price *et al.*, 2009) for the progression of nigral damage]. Classical anti-parkinsonian dopaminergic-replacement therapy also possesses the same disadvantage of inducing symptom relief without delaying disease progression (Pezzoli and Zini, 2010). Therefore, the search for novel compounds that will simultaneously ameliorate motor symptoms and delay progression of nigral damage represents an important challenge for this disease. In this study, we have examined a phytocannabinoid compound, Δ^9 -THCV, whose structural similarity to Δ^9 -THC and ability to block CB₁ receptors but activate CB₂ receptors (Thomas *et al.*, 2005; Pertwee *et al.*, 2007; Bolognini *et al.*, 2010), indicated *a priori* that it might meet this need both to relieve parkinsonian symptoms and to protect nigral neurones from death.

Here we have demonstrated that an acute injection of Δ^9 -THCV is efficacious in reducing motor inhibition in par-

kinsonian rats, with a potency equivalent to rimonabant. We also found that, as described previously for rimonabant (García-Arencibia *et al.*, 2008), these effects were dopamine-independent and associated with changes in glutamatergic transmission in key structures of the basal ganglia. For example, the administration of Δ^9 -THCV tended to elevate glutamate levels in the striatum, an effect that may be associated with a blockade of CB₁ receptors located in corticostriatal glutamatergic terminals, in accordance with the stimulant effects of rimonabant on glutamate release found previously by using *in vivo* microdialysis (García-Arencibia *et al.*, 2008) and with the well-known ability of CB₁ agonists to reduce the release of this transmitter (Adermark *et al.*, 2009). Any benefits resulting from this increase in glutamate might be mediated by glutamatergic receptor subtypes (e.g. group III metabotropic receptors) located in striatopallidal neurones that have been proposed to induce anti-parkinsonian effects (Ossowska *et al.*, 2007). It is also important to note that this stimulating effect on glutamatergic transmission is particularly marked in conditions of

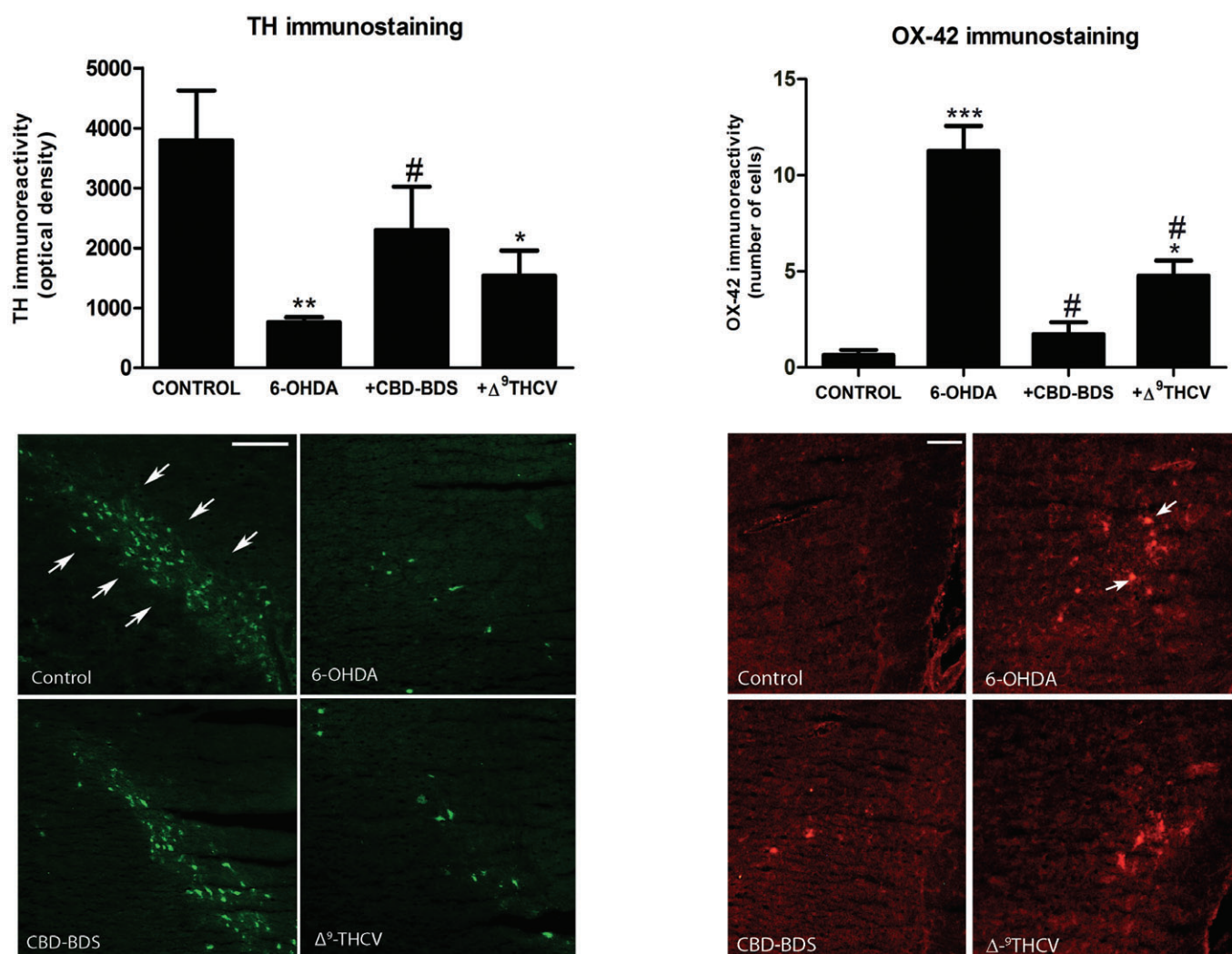


Figure 4

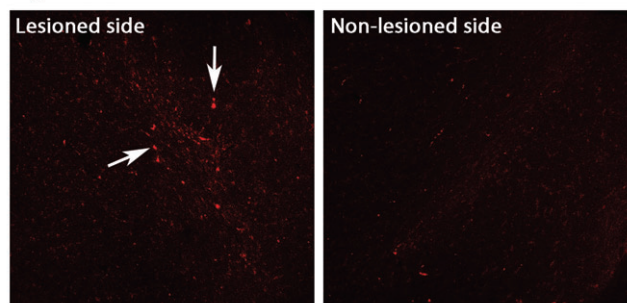
Tyrosine hydroxylase and OX-42 immunoreactivity measured in the substantia nigra of rats injected i.c.v. with 6-hydroxydopamine or saline (control rats) and subjected to chronic i.p. treatment with Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹; 14 days), CBD-enriched botanical extract (4.63 mg·kg⁻¹, equivalent to 3 mg·kg⁻¹ of pure CBD; 14 days) or vehicle, starting 16 h after the i.c.v. injection. Values are means \pm SEM (n = 5–6 rats per group), and the data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student–Newman–Keuls test (* P < 0.05, ** P < 0.005, *** P < 0.0005 vs. controls; # P < 0.05 vs. 6-hydroxydopamine-lesioned animals). Representative tyrosine hydroxylase- and OX-42-immunostained sections of the substantia nigra are shown for the four experimental groups in the lower panels (scale bar = 100 μ m for tyrosine hydroxylase and 50 μ m for OX-42). Tyrosine hydroxylase- and OX-42-positive cells are indicated with arrows.

nigrostriatal dopaminergic denervation, being very modest in control animals, as described previously (García-Arencibia *et al.*, 2008). This might be because dopaminergic denervation of the striatum may particularly affect CB₁ receptors located in corticostriatal terminals, thus enabling a greater control of glutamate transmission by these receptors in conditions such as PD. Thus, such denervation was found some time ago, in experiments using autoradiography and *in situ* hybridization that do not allow cellular resolution, to be associated with an up-regulation of CB₁ receptors in different neuronal subpopulations within the striatum (Mailleux and Vanderhaeghen, 1993; Lastres-Becker *et al.*, 2001).

Glutamate levels in the substantia nigra of parkinsonian animals were reduced by Δ^9 -THCV. In our opinion, this was

not the result of a direct action of Δ^9 -THCV on CB₁ receptors located in subthalamonigral terminals. Instead, it was most likely an indirect effect that resulted from blockade of CB₁ receptors located on striatopallidal terminals that, by enhancing GABA uptake (Maneuf *et al.*, 1996), would be expected to cause a reduction in the activity of these neurones and a subsequent decrease in their tonic inhibitory action on GABAergic neurones projecting from the globus pallidus to the subthalamic nucleus, resulting in a greater inhibition of glutamate release from subthalamonigral neurones. This would be expected to correct the excessive subthalamonigral activity underlying parkinsonian symptoms such as tremor (Nagatsu and Sawada, 2007), which, in our 6-hydroxydopamine-lesioned animals, was only evident as a

CB₂ immunostaining in 6-hydroxydopamine-lesioned rats



Loss of TH-positive neurons after unilateral 6-hydroxydopamine lesion (wild-type vs. knockout)

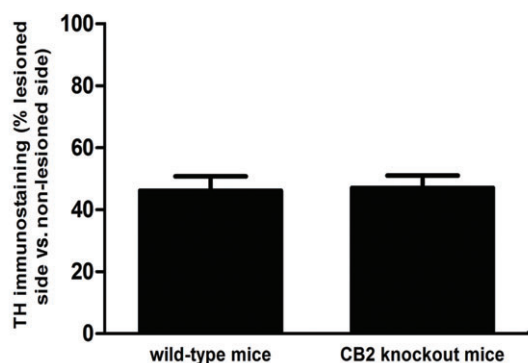


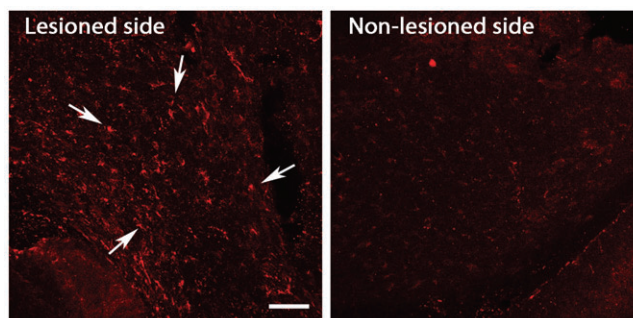
Figure 5

Top panel: representative CB₂ receptor-immunostained sections of the substantia nigra of rats unilaterally injected with 6-hydroxydopamine. Scale bar = 100 μm. CB₂ receptor-positive cells are indicated with arrows. Bottom panel: tyrosine hydroxylase immunostaining measured in the substantia nigra of CB₂ receptor-deficient and wild-type mice unilaterally injected with 6-hydroxydopamine. Values are means ± SEM ($n = 5-6$ mice per group) and are expressed as % of immunoreactivity in the lesioned side versus the non-lesioned side in the same animal. Data were subjected to Student's *t*-test.

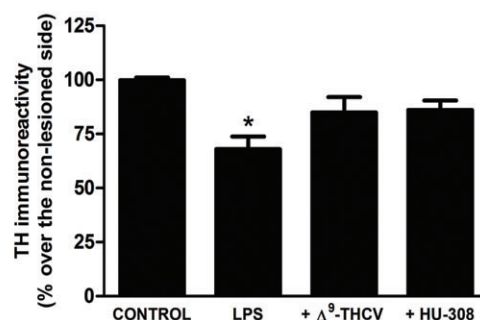
trend towards an increase in glutamate content in the substantia nigra. Such a correction is fully concordant with the type of effect expected for an anti-parkinsonian agent.

The attenuation of motor inhibition via modulation of excitatory transmission is not the only beneficial effect that Δ^9 -THCV may provide in PD. Thus, given its classical phytocannabinoid structure, this compound may serve as an antioxidant agent with the same efficacy as CBD or Δ^9 -THC, two cannabinoids that have been demonstrated to be neuroprotective in 6-hydroxydopamine-lesioned rats (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007). In addition, Δ^9 -THCV is also a potent CB₂ receptor agonist that may share the ability of other agonists of this receptor to protect against nigrostriatal cell loss in MPTP-lesioned mice (Price *et al.*, 2009). However, in our previous studies conducted in 6-hydroxydopamine-lesioned rats, we found that selective CB₂ agonists did not have protective effects (García-Arencibia *et al.*, 2007), and we have found here that CB₂ receptors are poorly up-regulated in response to damage in these animals. This may be related to the fact that inflammation is a

CB₂ immunostaining in LPS-lesioned mice



Effects of Δ^9 -THCV in LPS-lesioned mice



Loss of TH-positive neurons after unilateral LPS lesion (wild-type vs. knockout)

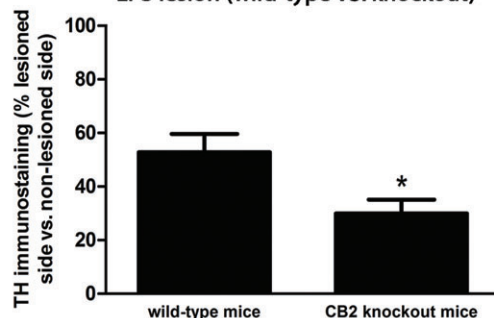


Figure 6

Top panel: representative CB₂ receptor-immunostained sections of the substantia nigra of mice unilaterally injected with LPS. Scale bar = 100 μm. CB₂ receptor-positive cells are indicated with arrows. Middle panel: tyrosine hydroxylase immunoreactivity measured in the substantia nigra of mice unilaterally injected with LPS or saline (control mice) and subjected to chronic i.p. treatment with Δ^9 -THCV (2 mg·kg⁻¹), HU-308 (5 mg·kg⁻¹) or vehicle (14 days), starting 16 h after the LPS injection. Values are means ± SEM ($n = 5-6$ mice per group), and the data were subjected to one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls test (* $P < 0.05$ vs. the remaining groups). Bottom panel: tyrosine hydroxylase immunostaining measured in the substantia nigra of CB₂ receptor-deficient and wild-type mice unilaterally injected with LPS. Values are means ± SEM ($n = 5-6$ mice per group) and are expressed as % of immunoreactivity in the lesioned side versus the non-lesioned side in the same animal. Data were subjected to Student's *t*-test (* $P < 0.05$ vs. wild-type animals).

secondary event in 6-hydroxydopamine-lesioned animals, as reflected by the modest levels of OX-42 immunoreactivity found in the substantia nigra in the model used in our present study. With this idea in mind, we investigated whether Δ^9 -THCV induces neuroprotective effects when administered daily for 14 days to 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Our data strongly demonstrated that Δ^9 -THCV partially reduced 6-hydroxydopamine-induced nigral damage as shown by measuring tyrosine hydroxylase immunostaining and by the ability of this cannabinoid to attenuate OX-42 immunoreactivity (indicative of reactive microgliosis). Both responses were also elicited by CBD-enriched botanical extract, in accordance with previous data obtained with pure CBD (Lastres-Becker *et al.*, 2005; García-Arencibia *et al.*, 2007). The effects of CBD, which does not bind CB₂ receptors except at high concentrations, were in general of greater magnitude than the effects of Δ^9 -THCV, thus supporting the hypothesis that the antioxidant activity of both phytocannabinoids is possibly the key mechanism providing neuroprotection in this model of PD. This hypothesis is also supported by our observation that 6-hydroxydopamine lesions were of similar magnitude in CB₂-deficient and wild-type mice, and by the above-mentioned poor up-regulation of CB₂ receptors in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. In this context, our data also suggest that the combined administration of both phytocannabinoids may enhance their neuroprotective properties in 6-hydroxydopamine-lesioned animals, while retaining the symptom-relieving effects of Δ^9 -THCV alone. On the other hand, although the neuroprotective effects of Δ^9 -THCV do not appear to be related to its ability to activate CB₂ receptors in the model of 6-hydroxydopamine used here, we assume that this property may be more important in pro-inflammatory models of PD, as well as an important factor to consider when developing a Δ^9 -THCV-based therapy for PD patients where inflammation is also a key element in the pathogenesis. To test this hypothesis, we used the LPS-lesioned mice model of PD where dopaminergic cell death is caused predominantly by inflammatory events. The substantia nigra of these animals exhibited a more intense up-regulation of CB₂ receptors compared both with the contralateral non-lesioned structures and to 6-hydroxydopamine-lesioned rats, and, accordingly, the treatment with Δ^9 -THCV also led to neuroprotection. We assume that this neuroprotective effect was a result of Δ^9 -THCV-induced activation of CB₂ receptors, as it was mimicked in the same model of PD by HU-308, a selective CB₂ receptor agonist, whereas mice lacking CB₂ receptors appeared to be particularly vulnerable to LPS lesion.

Conclusion

In summary, given its antioxidant properties and its ability to activate CB₂ but block CB₁ receptors at a dose of 2 mg·kg⁻¹, Δ^9 -THCV seems to have an interesting and therapeutically promising pharmacological profile. Thus, in contrast to other phytocannabinoids that have been investigated to date, it shows promise both for the treatment of disease progression in PD and for the relief of PD symptoms. This represents an important advance in the search for potential novel anti-

parkinsonian agents, since Δ^9 -THCV administered alone or in combination with CBD may provide a much needed improved treatment for PD.

Acknowledgements

This work has been supported by grants from CIBERNED (CB06/05/0089), MICINN (SAF2006-11333 and SAF2009/11847), CAM (S-SAL-0261/2006) and GW Pharmaceuticals Ltd. These agencies had no further role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. Authors are indebted to Yolanda García-Movellán for administrative assistance.

Conflict of interest

Authors have formal links with GW Pharmaceuticals that funds some of their research.

References

- Adermark L, Talani G, Lovinger DM (2009). Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci* 29: 32–41.
- Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU *et al.* (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol* 210: 182–193.
- Bolognini D, Costa B, Maione S, Comelli F, Marini P, Di Marzo V *et al.* (2010). The plant Δ^9 -tetrahydrocannabinol can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br J Pharmacol* 160: 677–687.
- Buckley NE (2008). The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* 153: 309–318.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC *et al.* (2000). Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB₂ receptor. *Eur J Pharmacol* 396: 141–149.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J* 14: 1432–1438.
- Fernández-Espejo E, Caraballo I, Rodríguez de Fonseca F, Ferrer B, El Banoua F, Flores JA *et al.* (2004). Experimental parkinsonism alters anandamide precursor synthesis, and functional deficits are improved by AM404: a modulator of endocannabinoid function. *Neuropsychopharmacology* 29: 1134–1142.
- Fernández-Espejo E, Caraballo I, Rodríguez de Fonseca F, El Banoua F, Ferrer B, Flores JA *et al.* (2005). Cannabinoid CB₁ antagonists possess antiparkinsonian efficacy only in rats with very severe nigral lesion in experimental parkinsonism. *Neurobiol Dis* 18: 591–601.



Ferrer B, Asbrock N, Kathuria S, Piomelli D, Giuffrida A (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci* 18: 1607–1614.

García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 1134: 162–170.

García-Arencibia M, Ferraro L, Tanganelli S, Fernández-Ruiz J (2008). Enhanced striatal glutamate release after the administration of rimonabant to 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neurosci Lett* 438: 10–13.

García-Arencibia M, García C, Fernández-Ruiz J (2009). Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8: 432–439.

González S, Scorticati C, García-Arencibia M, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz J (2006). Effects of rimonabant, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1073–1074: 209–219.

Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D *et al.* (2002). Experimental parkinsonism alters endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci* 22: 6900–6907.

Hunter RL, Cheng B, Choi DY, Liu M, Liu S, Cass WA *et al.* (2009). Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res* 87: 1913–1921.

Jiménez-Del-Río M, Daza-Restrepo A, Velez-Pardo C (2008). The cannabinoid CP55,940 prolongs survival and improves locomotor activity in *Drosophila melanogaster* against paraquat: implications in Parkinson's disease. *Neurosci Res* 61: 404–411.

Kelsey JE, Harris O, Cassin J (2009). The CB1 antagonist rimonabant is adjunctively therapeutic as well as monotherapeutic in an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 203: 304–307.

Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos M, Zeng B-Y, Jenner P, Ramos JA *et al.* (2001). Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. *Eur J Neurosci* 14: 1827–1832.

Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J (2005). Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 19: 96–107.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.

Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1993). Dopaminergic regulation of cannabinoid receptor mRNA levels in the rat caudate-putamen: an in situ hybridization study. *J Neurochem* 61: 1705–1712.

Maneuf YP, Nash JE, Crossman AR, Brotchie JM (1996). Activation of the cannabinoid receptor by Δ^9 -tetrahydrocannabinol reduces gamma-aminobutyric acid uptake in the globus pallidus. *Eur J Pharmacol* 308: 161–164.

Mesnage V, Houeto JL, Bonnet AM, Clavier I, Arnulf I, Cattelin F *et al.* (2004). Neurokinin B, neurotensin, and cannabinoid receptor antagonists and Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 27: 108–110.

Nagatsu T, Sawada M (2007). Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. *J Neural Transm Suppl* 72: 113–120.

Ossowska K, Konieczny J, Wardas J, Pietraszek M, Kuter K, Wolfarth S *et al.* (2007). An influence of ligands of metabotropic glutamate receptor subtypes on parkinsonian-like symptoms and the striatopallidal pathway in rats. *Amino Acids* 32: 179–188.

Paxinos G, Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: London.

Pérez-Rial S, García-Gutiérrez MS, Molina JA, Pérez-Nievas BG, Ledent C, Leiva C *et al.* (2010). Increased vulnerability to 6-hydroxydopamine lesion and reduced development of dyskinesias in mice lacking CB1 cannabinoid receptors. *Neurobiol Aging* 32: 631–645.

Pertwee RG, Thomas A, Stevenson LA, Ross RA, Varvel SA, Lichtman AH *et al.* (2007). The psychoactive plant cannabinoid, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, is antagonized by Δ^8 - and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin in mice in vivo. *Br J Pharmacol* 150: 586–594.

Pezzoli G, Zini M (2010). Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. *Expert Opin Pharmacother* 11: 627–635.

Pisani A, Fezza F, Galati S, Battista N, Napolitano S, Finazzi-Agro A *et al.* (2005). High endogenous cannabinoid levels in the cerebrospinal fluid of untreated Parkinson's disease patients. *Ann Neurol* 57: 777–779.

Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernández E *et al.* (2009). WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 29: 2177–2186.

Rodríguez Díaz M, Abdala P, Barroso-Chinea P, Obeso J, González-Hernández T (2001). Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 122: 79–92.

Romero J, Berrendero F, Pérez-Rosado A, Manzanares J, Rojo A, Fernández-Ruiz J *et al.* (2000). Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal dopaminergic neurons increased CB1 receptor mRNA levels in the caudate-putamen. *Life Sci* 66: 485–494.

Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM (1999). Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci* 65: 703–713.

Segovia G, Mora F, Crossman AR, Brotchie JM (2003). Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord* 18: 138–149.

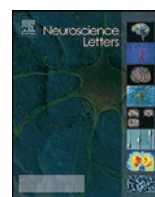
Thomas B, Beal MF (2007). Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 16: R183–R194.

Thomas A, Stevenson LA, Wease KN, Price MR, Baillie G, Ross RA *et al.* (2005). Evidence that the plant cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 146: 917–926.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Short communication

Identification of CB₂ receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease

María Concepción García^{a,b,c}, Valentina Cinquina^{a,d}, Cristina Palomo-Garo^{a,b,c},
Alberto Rábano^e, Javier Fernández-Ruiz^{a,b,c,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

^c Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Spain

^d Department of Theoretical and Applied Sciences, University of Insubria, Italy

^e Banco de Tejidos, Fundación CIEN (FCIEN-ISCIII), Madrid, Spain

H I G H L I G H T S

- CB₂ receptors were found in nigrostriatal neurons in the human substantia nigra.
- Their levels were lower in the substantia nigra of Parkinson's disease patients.
- The levels of this receptor could serve as a biomarker for this disorder.

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 31 July 2014

Received in revised form 25 October 2014

Accepted 1 December 2014

Available online 3 December 2014

Keywords:

CB₂ receptors

Cannabinoids

Tyrosine hydroxylase-containing neurons

Parkinson's disease

Basal ganglia

A B S T R A C T

It is well-demonstrated that cannabinoid CB₂ receptors located in glial cells are up-regulated in neurodegenerative disorders serving as a target to control glial influences to neurons. Recent evidence indicates that CB₂ receptors may be also located in certain neuronal subpopulations and serve as a marker of neuronal losses. We investigated this possibility in the post-mortem substantia nigra of Parkinson's disease (PD) patients and controls. Immunostaining for the CB₂ receptor was found in tyrosine hydroxylase-positive neurons in the substantia nigra, a fact confirmed with double-staining analyses. The signal was found in controls but also in PD patients, in which CB₂ receptor labelling was significantly lower, in parallel to the losses of these neurons experienced in the disease. These data show for the first time that CB₂ receptors are located in tyrosine hydroxylase-containing neurons in the substantia nigra at levels significantly lower in PD patients compared to controls.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The cannabinoid type-2 (CB₂) receptor was identified first in the immune system [1] but not in the central nervous system (CNS) [2], being proposed as the peripheral receptor for the endocannabinoid system [3]. However, further studies re-examined their presence in the healthy brain and identified CB₂ receptors in astrocytes [4], oligodendrocytes [5], quiescent [6] and perivascular microglia [7], neural progenitors [8], and even in a few subpopulations of neurons

[6], although with a much more restricted distribution in the CNS compared to the CB₁ receptor. Additional studies demonstrated that the levels of CB₂ receptors experience a dramatic increase in numerous pathological conditions affecting the CNS, particularly those that are produced by inflammatory/degenerative stimuli, and in which these up-regulatory responses have been identified predominantly in reactive glial cells [9–11]. This includes Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, Huntington's chorea, Parkinson's disease (PD) and others [9–11]. These observations provided arguments supporting the idea that this receptor may serve: (i) as a pathological biomarker, for example, the extent of CB₂ receptor expression has been related to malignancy in glial tumours [12]; and (ii) as a pharmacological target to control glial activation and their effects on neuronal homeostasis in neurodegenerative disorders [9,10].

* Corresponding author at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040, Madrid, Spain.
Tel.: +34 91 3941450; fax: +34 91 3941691.

E-mail address: jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz).

As mentioned above, CB₂ receptors are also present in neurons in the healthy brain, but only in a few subpopulations predominantly located in the brainstem [13], cerebellum, e.g. Purkinje [4] and granular [14] neurons, and basal ganglia, e.g. pallidothalamic neurons [15]. Some studies extended this presence to numerous cortical and subcortical structures [16,17], but the problems of specificity of the anti-CB₂ receptor antibodies used and the lack of the necessary methodological controls [6,18] have generated some controversy about these data. We recently found CB₂ receptor immunostaining in different neuronal subpopulations in the human cerebellum, e.g. Purkinje cells, using the necessary negative and positive controls to ensure the specificity of the immunolabelling found [4]. We also demonstrated how this immunostaining is affected in autosomal-dominant hereditary ataxias [4], for which it appears to serve as a marker of neuronal injury. We have now extended our interest to another neuronal subpopulation, neuromelanin-containing neurons in the substantia nigra that are dramatically affected in PD. In the present study, we used immunohistochemical procedures to label CB₂ receptors in the human post-mortem substantia nigra from PD patients and control subjects, and confirmed their presence in tyrosine hydroxylase-containing neurons by double-staining methods.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

We used post-mortem human substantia nigra from control subjects and patients with diagnosis of PD that were obtained from two biobanks: “Fundación CIEN”, Madrid, Spain, and “Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic”, Barcelona, Spain. All material has been collected from donors for and from whom a written informed consent for a brain autopsy and the use of material and clinical information for research purposes had been obtained from both biobanks. Our study was approved by the Committee for Clinical Research of our institution. Samples (one section/patient) were received once fixed, paraffinized, sliced (3–5 µm) and mounted on glass slides. Table 1 summarizes the major characteristics of all individuals included in our analyses. They were selected to have an adequate matching by age, gender and post-mortem delay, as well as to avoid the presence of potential influencing factors, e.g. additional diseases in the case of PD patients, interfering causes of death in the case of controls. The neuropathological data provided by the biobanks confirmed that all patients exhibited a marked atrophy of the substantia nigra with evidence of neuronal loss. We also considered the pharmacological information (medication and intoxication history) of PD patients provided by the biobanks, which included the classic dopaminergic replacement therapy, e.g. levodopa, dopamine agonists. Medication and intoxication history of control subjects were also available and revised in the selection of cases to

avoid any possible influence in the parameters controlled in this study.

2.2. Immunohistochemistry

The protocol used was previously described [19]. Briefly, tissue sections were deparaffinized, rehydrated in grade alcohol and washed extensively in 50 mM, pH 7.4, potassium phosphate-buffered saline (KPBS). To obtain more efficient immunostaining, tissue sections were irradiated in microwaves in a solution containing antigen retrieval solution pH 6 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) [20]. After irradiated, samples were removed and washed extensively in KPBS. Then, endogenous peroxidase was blocked by 30 min incubation at room temperature in peroxidase blocking solution (Dako Cytomation). After several washes with KPBS, tissues were incubated with the monoclonal anti-CB₂ receptor antibody (R and D systems, Minneapolis, MN, USA, diluted 1:100 in KPBS containing 5% horse serum albumin (Sigma Chem., Madrid, Spain) and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chem.), overnight at room temperature. After incubation, sections were washed in KPBS, followed by incubation with biotinylated horse anti-mouse antibody (1:200) for 1 h at room temperature. Avidin–biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and a 3,3'-diaminobenzidine substrate–chromogen system (Dako Cytomation) were used to obtain a visible reaction product. Negative controls were used in each case by omitting primary antibody as well as by using an immunogenic blocking peptide following a previously-published procedure [4]. Sections were dehydrated, sealed, and coverslipped. A Leica DMRB microscope with DFC300FX camera (Leica, Wetzlar, Germany) were used for the observations and photography of the slides, respectively. Quantification of CB₂ immunostaining was carried out on high-resolution digital microphotographs that were taken with the 5× objective and under the same conditions of light and brightness/contrast. They were used to measure the mean density of labelling in the selected area, using the analysis software ImageJ (NIH, USA), which allows to be calibrated in a way that minimizes the influence of different backgrounds. Five images were taken for each case. All data were expressed in arbitrary units.

2.3. Immunofluorescence

To identify the specific cell population in which CB₂ receptor labelling is located, we performed double-staining analysis combining the anti-CB₂ antibody (diluted 1/50) with a monoclonal antibody against tyrosine hydroxylase (Chemicon-Millipore, Temecula, CA, USA; diluted 1:500). After the antigen retrieval procedure, tissue sections were washed with pH 7.4 PBS before overnight incubation at room temperature with the anti-CB₂ receptor antibody, followed by incubation with an anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 2 h. Afterwards, the anti-tyrosine hydroxylase anti-

Table 1

Major characteristics of patients and control subjects whose postmortem samples were used in this study (they were obtained from the biobanks of the “Fundación CIEN”, Madrid, Spain, and “Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic”, Barcelona, Spain).

Subject #	Age	Gender	Diagnosis	Postmortem delay (min)	Biobank
1	57	Female	Control	60	FCIEN
2	81	Male	Control	540	FCIEN
3	56	Male	Control	<480	FCIEN
4	66	Male	Control	420	HClínic
5	74	Female	Control	220	HClínic
6	82	Female	Parkinson's disease	<480	FCIEN
7	75	Male	Parkinson's disease	480	FCIEN
8	75	Male	Parkinson's disease	<480	FCIEN
9	81	Male	Parkinson's disease	330	HClínic
10	79	Female	Parkinson's disease	210	HClínic

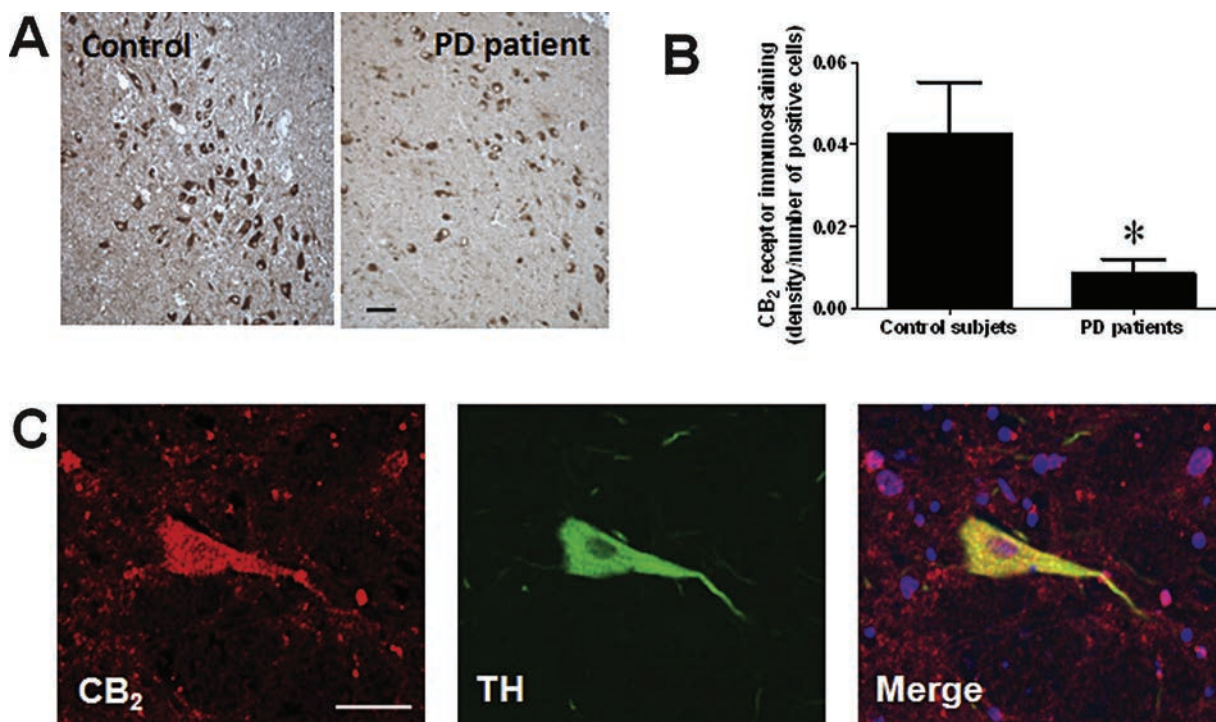


Fig. 1. A: Representative microphotographs corresponding to CB₂ receptor immunostaining in the substantia nigra of one PD patient (subject #7) and one control (subject #5) (scale bar = 100 μ m). B: Quantification of CB₂ receptor immunostaining in the substantia nigra of PD patients and control subjects. Values are means \pm SEM ($n = 5$ subjects per group) and the data were subjected to the Student's *t*-test (* $p < 0.005$). C: Representative double-staining microphotographs of the substantia nigra of a control (subject #2) obtained with the anti-CB₂ receptor antibody (red fluorescence), with the anti-tyrosine hydroxylase antibody (green fluorescence) and with the merged staining (scale bar = 50 μ m). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

body was incubated overnight at room temperature after extensive washes in PBS, followed by incubation with an anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Invitrogen). Sections were counter-stained with nuclear stain bisBenzimide (Hoechst 33,258; Sigma Chem.) to visualise cell nuclei. To quench endogenous autofluorescence, tissue sections were treated with 1% Sudan Black (Merck, Darmstadt, Germany) in 70% ethanol for 5 min and differentiated with 70% ethanol [21]. Sections were mounted onto glass slides with aqueous solution (Vector Laboratories) and were viewed in a Leica TCS SP5 confocal microscope system.

2.4. Statistics

Data were assessed by the unpaired Student's *t*-test.

3. Results and discussion

Our objective was to demonstrate that CB₂ receptors are present in neuromelanin-containing neurons in the human substantia nigra, following recent studies that demonstrated their presence in a few neuronal subpopulations in rodents, e.g. brainstem neurons [13], cerebellar granule neurons [14]; non-human primates, e.g. pallidothalamic neurons [15] and humans, e.g. Purkinje neurons [4]. It is important to remark that these neuronal sites would be certainly restricted, as most of CB₂ receptor present in the CNS would be located in glial elements, in particular when these become activated due to damaging stimuli [9,10], also in PD [22,23]. However, contrarily to previous ideas that indicated that the unique cannabinoid receptor present in neurons is the CB₁ receptor [2], some neuronal subpopulations appear also to express CB₂ receptors. In the present study, post-mortem brain sections containing the substantia nigra were subjected to immunohistochemical procedures with a selective CB₂ receptor antibody already characterised for human samples [4]. Using 3,3'-diaminobenzidine immunostain-

ing, we were able to identify CB₂ receptors presumably located in nigral neurons (Fig. 1A). When we used double-staining methods, we found that neurons labelled with the CB₂ receptor antibody were also positive for tyrosine hydroxylase, confirming that they correspond to neuromelanin-containing neurons in the human substantia nigra (Fig. 1C). The signal was found at intracellular sites (Fig. 1C), which presumably corresponds to receptor trafficking, and it was found in control subjects, but also in PD patients. However, in this case, the labelling for the CB₂ receptor was significantly lower (Fig. 1B), in concordance with the expected loss of these neurons occurring in PD, although the reduction in CB₂ receptor immunostaining in PD patients was evident when the data reflected the number of immunostained cells, but apparently also when the quantification was expressed as immunostaining density per number of positive cells (see Fig. 1B). This indicates that the reduction of CB₂ receptors was caused by loss of positive cells but also by a reduced expression in surviving cells. It could be possible that this phenomenon has any relation with the on-going pathological process, but this will require additional investigation.

Although this was not the objective of the present study, it is important to note that we also detected CB₂ receptor immunostaining in glial elements in these human samples (data not shown), which is in concordance with some recent studies conducted in experimental models of PD [22,23]. Thus, Price et al. [22] found an up-regulatory response of CB₂ receptors located in microglial cells in MPTP-lesioned mice. CB₂ receptor up-regulation was also found in LPS-lesioned mice, a response that would presumably occur also in glial cells although this was not determined in this study [23]. By contrast, CB₂ receptor up-regulation was very poor [23], and their activation did not reduce nigrostriatal damage [24], in 6-hydroxydopamine-lesioned rats, although mice overexpressing CB₂ receptors appeared to be more protected from the damage caused by application of 6-hydroxydopamine [25].

4. Conclusions

Our data show for the first time a neuronal location for the CB₂ receptor in the human substantia nigra in healthy conditions, likely in tyrosine hydroxylase-containing neurons that degenerate in PD, which explain the significant reduction in CB₂ receptor immunostaining found in these neurons in PD patients. The presence of CB₂ receptors in tyrosine hydroxylase-containing neurons may serve for the development of a possible biomarker of malfunctioning/deficits of this neuronal subpopulation, in particular PD

5. Authors' contribution

CG supervised and conducted all immunolabelling procedures. VC and CPG participated in these analyses. AR selected the tissues from patients and controls and participated in their neuropathological characterization. JFR designed and coordinated the whole study, analysed the data with CG and prepared the manuscript for submission, which was approved by all authors.

Acknowledgements

This work has been funded by grants from CIBERNED (CB06/05/0089), MINECO (SAF2012/39173) and CAM (S2010/BMD-2308). CG, CPG and JFR have formal links with GW Pharmaceuticals that funds some of their research. These agencies had no further role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication.

Authors are indebted to the biobanks of the “Fundación CIEN”, Madrid, Spain, and of the “Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic”, Barcelona, Spain, for providing the human tissues used in these studies, as well as to Yolanda García-Movellán for administrative assistance.

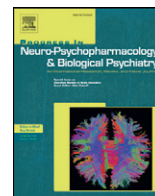
References

- [1] S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar, Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids, *Nature* 365 (1993) 61–65.
- [2] A.B. Lynn, M. Herkenham, Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 (1994) 1612–1623.
- [3] V. Di Marzo, 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance, *Biochim. Biophys. Acta* 1391 (1998) 153–175.
- [4] C. Rodríguez-Cueto, C. Benito, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, M.L. Hernández-Gálvez, M. Gómez-Ruiz, Changes in CB₁ and CB₂ receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1472–1489.
- [5] E. Molina-Holgado, J.M. Vela, A. Arévalo-Martín, G. Almazán, F. Molina-Holgado, J. Borrell, C. Guaza, Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling, *J. Neurosci.* 22 (2002) 9742–9753.
- [6] N. Stella, Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas, *Glia* 58 (2010) 1017–1030.
- [7] E. Núñez, C. Benito, M.R. Pazos, et al., Cannabinoid CB₂ receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study, *Synapse* 53 (2004) 208–213.
- [8] J. Palazuelos, T. Aguado, A. Egia, R. Mechoulam, M. Guzmán, I. Galve-Roperh, Non-psychoactive CB₂ cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation, *FASEB J.* 20 (2006) 2405–2407.
- [9] J. Fernández-Ruiz, J. Romero, G. Velasco, R.M. Tolón, J.A. Ramos, M. Guzmán, Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol. Sci.* 28 (2007) 39–45.
- [10] J. Fernández-Ruiz, C. García, O. Sagredo, M. Gómez-Ruiz, E. de Lago, The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage, *Expert Opin. Ther. Targets* 14 (2010) 387–404.
- [11] J.C. Ashton, M. Glass, The cannabinoid CB₂ receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration, *Curr. Neuropharmacol.* 5 (2007) 73–80.
- [12] C. Sánchez, M.L. de Ceballos, T. Gómez del Pulgar, et al., Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB₂ cannabinoid receptor, *Cancer Res.* 61 (2001) 5784–5789.
- [13] M.D. Van Sickle, M. Duncan, P.J. Kingsley, et al., Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors, *Science* 310 (2005) 329–332.
- [14] S.D. Skaper, A. Buriani, R. Dal Toso, L. Petrelli, S. Romanello, L. Facci, A. Leon, The ALAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 3984–3989.
- [15] J.L. Lanciego, P. Barroso-Chinea, A.J. Rico, et al., Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*, *J. Psychopharmacol.* 25 (2011) 97–104.
- [16] J.P. Gong, E.S. Onaivi, H. Ishiguro, Q.R. Liu, P.A. Tagliaferro, A. Brusco, G.R. Uhl, Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain, *Brain Res.* 1071 (2006) 10–23.
- [17] E.S. Onaivi, H. Ishiguro, J.P. Gong, et al., Brain neuronal CB₂ cannabinoid receptors in drug abuse and depression: from mice to human subjects, *PLoS ONE* 3 (2008) e1640.
- [18] B.K. Atwood, K. Mackie, CB₂: a cannabinoid receptor with an identity crisis, *Br. J. Pharmacol.* 160 (2010) 467–479.
- [19] C. Benito, W.K. Kim, I. Chavarría, et al., A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis, *J. Neurosci.* 25 (2005) 2530–2536.
- [20] S. Hisano, H. Haga, K. Miyamoto, E. Takeda, Y. Fukui, The basic amino acid transporter (rBAT)-like immunoreactivity in paraventricular and supraoptic magnocellular neurons of the rat hypothalamus, *Brain Res.* 710 (1996) 299–302.
- [21] S.A. Schnell, W.A. Staines, M.W. Wessendorf, Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue, *J. Histochem. Cytochem.* 47 (1999) 719–730.
- [22] D.A. Price, A.A. Martinez, A. Seillier, et al., WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 29 (2009) 2177–2186.
- [23] C. García, C. Palomo-Garo, M. García-Arencibia, J.A. Ramos, R.G. Pertwee, J. Fernández-Ruiz, Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease, *Br. J. Pharmacol.* 163 (2011) 1495–1506.
- [24] M. García-Arencibia, S. González, E. de Lago, J.A. Ramos, R. Mechoulam, J. Fernández-Ruiz, Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties, *Brain Res.* 1134 (2007) 162–170.
- [25] A. Ternianov, J.M. Pérez-Ortiz, M.E. Solesio, et al., Overexpression of CB₂ cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine, *Neurobiol. Aging* 33 (421) (2012) e1–16.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Potential of the cannabinoid CB₂ receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease

Yolanda Gómez-Gálvez, Cristina Palomo-Garo, Javier Fernández-Ruiz ^{*,1}, Concepción García ^{*,1}

Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain
 Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain
 Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Available online 9 April 2015

Keywords:

Cannabinoids
 CB₂ receptors
 Glial activation
 Inflammation
 LPS
 Parkinson's disease

ABSTRACT

Inflammation is an important pathogenic factor in Parkinson's disease (PD), so that it can contribute to kill dopaminergic neurons of the substantia nigra and to enhance the dopaminergic denervation of the striatum. The cannabinoid type-2 (CB₂) receptor has been investigated as a potential anti-inflammatory and neuroprotective target in different neurodegenerative disorders, but still limited evidence has been collected in PD. Here, we show for the first time that CB₂ receptors are elevated in microglial cells recruited and activated at lesioned sites in the substantia nigra of PD patients compared to control subjects. Parkinsonian inflammation can be reproduced experimentally in rodents by intrastriatal injections of lipopolysaccharide (LPS) which, through an intense activation of glial elements and peripheral infiltration, provokes a rapid deterioration of the striatum that may extend to the substantia nigra too. Using this experimental model, we recently described a much more intense deterioration of tyrosine hydroxylase (TH)-containing nigral neurons in CB₂ receptor-deficient mice compared to wild-type animals, supporting a potential neuroprotective role for this receptor. In the present study, we further explored this issue. First, we found elevated levels of the CB₂ receptor measured by qRT-PCR in the striatum and substantia nigra of LPS-lesioned mice, as well as an increase in the immunostaining for this receptor in the LPS-lesioned striatum. Second, we found a significant increase in CD68 immunostaining, which serve to identify activated microglia and also infiltrated peripheral macrophages, in these brain structures in response to LPS insult, which was much more intense in CB₂ receptor-deficient mice in the case of the substantia nigra. Next, we observed that the activation of CB₂ receptors with a selective agonist (HU-308) reversed LPS-induced elevation of CD68 immunostaining in the striatum and the parallel reduction in TH immunostaining. Lastly, we found that LPS elevated the gene expression of different pro-inflammatory mediators in both the striatum and the substantia nigra, whereas the selective activation of CB₂ receptors reduced a part of these mediators, e.g. inducible nitric oxide synthase, although exclusively in the striatum. In conclusion, we have provided the first evidence on the up-regulation of CB₂ receptors in glial elements in postmortem tissues of PD patients, which has been confirmed in an inflammatory model of this disease. In addition, we have provided evidence on the benefits derived from their activation in relation with the activation of microglial cells, the infiltration of macrophages and also certain capability of these cells to generate proinflammatory factors.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cannabinoids have important anti-inflammatory properties that may preserve neuronal homeostasis and survival in different neuroinflammatory/neurodegenerative disorders (Chiurchiù et al., in press). These effects are preferentially exerted by the activation of the cannabinoid type-2 (CB₂) receptor (Fernández-Ruiz et al., 2007), although recent studies also situate the cannabinoid type-1 (CB₁) receptor (Chung et al., 2011; de Lago et al., 2012) and even the nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family (Fidaleo et al., 2014) as additional potential targets for the anti-inflammatory action of certain cannabinoids. The anti-inflammatory properties of compounds activating the CB₂

Abbreviations: CB₁ receptor, cannabinoid type-1 receptor; CB₂ receptor, cannabinoid type-2 receptor; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; KPBS, potassium phosphate-buffered saline; LPS, lipopolysaccharide; PBS, phosphate-buffered saline; PD, Parkinson's disease; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TGF-β, transforming growth factor-β; TH, tyrosine hydroxylase; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

^{*} Corresponding authors at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913941450.

E-mail addresses: jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz), conchig@med.ucm.es (C. García).

¹ Both authors shared the senior authorship.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.03.017>
 0278-5846/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

receptors are facilitated by the presence of these receptors in glial cells, mainly astrocytes and microglial cells, and the up-regulatory response that they experience when these cells become reactive in inflammatory, excitotoxic, oxidative or infectious conditions (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010). Frequently, glial CB₂ receptors may work alone but they can also work in conjunction with CB₁ receptors, for example in the regulation of astrocyte activity in conditions of brain damage (reviewed by Stella, 2010). Irrespective of the cannabinoid receptor type involved, the benefits that cannabinoids may provide appear to be associated with the trophic role exerted by these glial cells, including improvements in the supply of metabolic substrates to neurons (lactate or ketone bodies: Duarte et al., 2012). They could act: (i) by enhancing the generation of neurotrophins or anti-inflammatory/pro-survival mediators that could potentially rescue damaged neurons, e.g., interleukin-10 (IL-10), IL-1 receptor antagonists, transforming growth factor- β (TGF- β) (Molina-Holgado et al., 2003; Smith et al., 2000), and/or (ii) by inhibiting the production of chemokines by astrocytes, e.g., fractalkine (Sheng et al., 2009). In contrast to astrocytes, the effects of cannabinoids on microglial cells are much more dependent on CB₂ receptor function. Indeed, CB₂ receptors appear to play an important role in the proliferation and migration of these cells at lesion sites (Carrier et al., 2004; Walter et al., 2003). In addition, the activation of CB₂ receptors dampens the generation of a variety of neurotoxic factors by microglial cells (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010), for example tumor necrosis factor- α (TNF- α), a major contributor to the pathophysiology of brain injury (reviewed by Stella, 2010). Activation of CB₂ receptors apparently inhibits the production of TNF- α by inhibiting NF- κ B (Oh et al., 2010), a transcription factor that plays a key role in the regulation of pro-inflammatory responses.

Therefore, the presence of CB₂ receptors in reactive microglia and also in activated astrocytes, places these receptors in a promising position for their use as a target for neuroprotection (Fernández-Ruiz et al., 2010). An important advantage of compounds targeting these receptors is that they do not provoke the frequent psychotropic side effects elicited by cannabinoids that activate the CB₁ receptor, indicating that they may be safe and well-tolerated in clinical applications. In addition, such pharmacological manipulations may be the best way to reproduce the endogenous response provoked by these receptors, which, as mentioned above, are up-regulated in activated astrocytes and, in particular, reactive microglia in response to inflammatory, excitotoxic and traumatic insults, such as those that occur in most of neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease, Huntington's chorea, amyotrophic lateral sclerosis and others (reviewed in Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010). This response, which had remained elusive for years, has been also identified in Parkinson's disease (PD) in a couple of recent studies. Thus, Price et al. (2009) described an elevation of CB₂ receptors in microglial cells recruited at the lesion sites in mice intoxicated with MPTP, a model with a modest glial response. In addition, these authors found that targeting these receptors reduced the damage of nigrostriatal neurons (Price et al., 2009), although a recent study showed that the inhibition of microglial activation and the preservation of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-lesioned mice involved surprisingly the activation of CB₁ receptors (Chung et al., 2011). In our laboratory, we studied this issue in a more inflammatory model of nigrostriatal damage consisting in intra-striatal injection of lipopolysaccharide (LPS) (García et al., 2011). We found elevated levels of CB₂ receptors in the striatum of LPS-lesioned mice, although we did not investigate the cell substrates in which this response is occurring (García et al., 2011). In addition, we found that CB₂ receptor-deficient mice were more vulnerable to LPS lesion than wild-type animals, a difference that was not found in mice lesioned with 6-hydroxydopamine, a model with poor inflammatory responses and in which the death of dopaminergic neurons is directly related to mitochondrial dysfunction and oxidative damage (García et al., 2011). In agreement with this difference, LPS-lesioned mice responded to compounds targeting the CB₂ receptor (García et al., 2011), whereas

6-hydroxydopamine-lesioned mice did not (García-Arencibia et al., 2007), although other authors described that mice overexpressing CB₂ receptors were more protected against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal damage (Ternianov et al., 2012). All this evidence supports that CB₂ receptor may be also a promising pharmacological target in PD, although more specifically in those conditions having greater glial activation and inflammatory events. In the present study, we wanted to further explore the issue by addressing some unexplored objectives: (i) to elucidate whether such up-regulatory response of CB₂ receptors also occurs in PD patients using postmortem tissues provided by two biobanks; (ii) to quantify the magnitude of such response in LPS-lesioned mice and the differences between wild-type and CB₂ receptor-knockout mice; and (iii) to investigate some molecular substrates presumably controlled by the selective activation of these receptors in LPS-lesioned mice.

2. Materials and methods

2.1. Human samples

We used post-mortem human substantia nigra from control subjects and patients with diagnosis of PD that were obtained from two biobanks: "Fundación CIEN", Madrid, Spain, and "Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic", Barcelona, Spain. All material has been collected from donors for and from whom a written informed consent for a brain autopsy and the use of material and clinical information for research purposes had been obtained from both biobanks. Our study was approved by the Committee for Clinical Research of our institution. Samples were received once fixed, paraffinized, sliced (3–5 μ m) and mounted on glass slides. Table 1 summarizes the major characteristics of all individuals included in our analyses. They were selected to have an adequate matching by age, gender and post-mortem delay, as well as to avoid the presence of potential influencing factors, e.g. additional diseases in the case of PD patients, interfering causes of death in the case of controls. The neuropathological data provided by the biobanks confirmed that all patients exhibited a marked atrophy of the substantia nigra with evidence of neuronal loss. We also considered the pharmacological information (medication and intoxication history) of PD patients provided by the biobanks, which included the classic dopaminergic replacement therapy, e.g. levodopa and dopamine agonists. Medication and intoxication history of control subjects was also available and revised in the selection of cases to avoid any possible influence in the parameters controlled in this study.

2.2. LPS-lesioned mice and pharmacological treatments

2.2.1. Animals

Male wild-type or CB₂^{-/-} mice (C57BL/6J background), bred in our animal facilities from mice donated by Dr. Nancy Buckley, California

Table 1

Major characteristics of patients and control subjects whose postmortem samples were used in this study (they were obtained from the biobanks of the "Fundación CIEN", Madrid, Spain, and "Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic", Barcelona, Spain).

Subject #	Age	Gender	Diagnosis	Postmortem delay (min)	Biobank
1	57	Female	Control	60	FCIEN
2	81	Male	Control	540	FCIEN
3	56	Male	Control	<480	FCIEN
4	66	Male	Control	420	HClínic
5	74	Female	Control	220	HClínic
6	82	Female	Parkinson's disease	<480	FCIEN
7	75	Male	Parkinson's disease	480	FCIEN
8	75	Male	Parkinson's disease	<480	FCIEN
9	81	Male	Parkinson's disease	330	HClínic
10	79	Female	Parkinson's disease	210	HClínic

State Polytechnic University, Pomona, CA, USA, (Buckley, 2008; Buckley et al., 2000), were housed in a room with a controlled photoperiod (08:00–20:00 light) and temperature (22 ± 1 °C). They had free access to standard food and water and were used at adult age (3–4 month-old; 25–30 g weight) for experimental purposes. All experiments were conducted according to Spanish and European guidelines (directive 86/609/EEC) and approved by the corresponding committee of our institution. The genetic profile of mice ($CB_2^{+/+}$, $CB_2^{+/-}$ and $CB_2^{-/-}$) was determined by PCR analysis, as described by Buckley et al. (2000), using DNA extracted from a piece of tail taken from each mouse. Only homozygous mice ($CB_2^{+/+}$ or $CB_2^{-/-}$) were used in these experiments.

2.2.2. Intrastratial lesions with LPS

Mice were anesthetized (ketamine 40 mg/kg + xylazine 4 mg/kg, i.p.) before receiving unilateral injections of *S. Minnesota* LPS (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) into two points of the right striatum following the procedure developed by Hunter et al. (2009). We used the following stereotaxic coordinates from bregma: +1.18 mm AP, –1.5 mm ML and –3.5 mm DV, as well as –0.34 mm AP, –2.5 mm ML and –3.2 mm DV (see details in Hunter et al., 2009). At each intrastratial coordinate, 5 µg of LPS in a volume of 1 µl of saline was injected slowly (0.5 µl/30 s) and the needle was left in place for 5 min before being slowly withdrawn. This avoids generating reflux and a rapid increase in intracranial pressure. Control animals were sham-operated and injected with 1 µl of saline using the same coordinates. This procedure leads to a deterioration of dopaminergic neurons caused predominantly by LPS-induced inflammatory events (Hunter et al., 2009). After the application of LPS or saline, animals were used for pharmacological treatments as described in the following section, although a separate group remained untreated for 2 weeks and was used for histological and biochemical analyses. Lastly, in a separate experiment, LPS was also administered to CB_2 -deficient and wild-type mice to evaluate possible differences in the response to LPS, following the same procedure described above.

2.2.3. Pharmacological treatments

LPS-lesioned mice were administered i.p. with the selective CB_2 receptor agonist HU-308 (5 mg/kg; purchased from Tocris Bioscience, Biogen Científica, Madrid, Spain) for a period of 14 days (one injection per day) starting shortly (approximately 16 h) after the lesion. A separate group of LPS-lesioned animals received vehicle (Tween 80-saline, 1:16). Two hours after the final injection, vehicle- or HU-308-injected LPS-lesioned animals and sham-operated controls were killed and processed as described below.

2.2.4. Sampling

Animals to be used for biochemical analysis (qRT-PCR) were killed by rapid and careful decapitation and their brains were rapidly removed and frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice, and stored at –80 °C up to be analyzed. In the case of animals to be used for immunohistochemical analysis, they were transcardially perfused with saline followed by fresh 4% paraformaldehyde [in 0.1 M phosphate buffered-saline (PBS)], and their brains were collected and postfixed overnight at 4 °C, cryoprotected with 30% sucrose in PBS and then frozen and stored at –80 °C up to be analyzed.

2.3. Immunohistochemical procedures

2.3.1. Human tissues

Tissue sections, as provided by the biobanks, were deparaffinized, rehydrated in grade alcohol and washed extensively in 0.1 M PBS, pH 7.4. To obtain more efficient immunostaining, tissue sections were irradiated in microwaves in a solution containing Antigen Retrieval Solution pH 6 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) (Hisano et al., 1996). After irradiated, samples were removed and washed extensively in PBS. Then, tissues were incubated with the following primary antibodies: (i) monoclonal mouse anti- CB_2 receptor antibody (R&D systems,

Minneapolis, MN, USA), diluted 1/50; (ii) polyclonal rabbit anti-Iba-1 antibody (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), diluted 1/300; or (iii) monoclonal mouse anti-CD68 antibody (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), diluted 1/200. Dilutions were carried out in PBS containing 5% normal horse serum and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chem., Madrid, Spain), and incubations were prolonged overnight at room temperature. After incubation, sections were washed in PBS, followed by incubation with the corresponding secondary antibodies conjugated with Alexa 546 or 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 2 h. Negative controls were used in each case by omitting primary antibody or by using an immunogenic blocking peptide. Sections were covered with glass slides and aqueous solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A Leica DMRB microscope and a DFC300FX camera (Leica, Wetzlar, Germany) were used for the observation and photography of the slides, respectively. Quantification of Iba-1 immunostaining was carried out on high-resolution digital microphotographs that were taken with the 20× objective and under the same conditions of light and brightness/contrast. They were used to measure the mean density of labeling in the selected area, using the analysis software ImageJ (NIH, USA), which allows to be calibrated in a way that minimizes the influence of different backgrounds. Analyses were always conducted by experimenters who were blinded to all animal characteristics. Data were expressed in arbitrary units. To identify the specific cell population in which CB_2 receptor labeling is located, we performed double-staining analysis combining the anti- CB_2 antibody (diluted 1/50) with the antibody against Iba-1 (diluted 1/300). After the antigen retrieval procedure, tissue sections were washed with pH 7.4 PBS before overnight incubation at room temperature with the anti- CB_2 receptor antibody, followed by incubation with an anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 37 °C for 2 h. Afterwards, the anti-Iba-1 antibody was incubated overnight at room temperature after extensive washes in PBS, followed by incubation with an anti-rabbit secondary antibody conjugated with Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Sections were counterstained with nuclear stain bisBenzimide (Hoechst 33258; Sigma Chem., Madrid, Spain) to visualize cell nuclei. To quench endogenous autofluorescence, tissue sections were treated with 1% Sudan Black (Merck, Darmstadt, Germany) in 70% ethanol for 5 min and differentiated with 70% ethanol. Sections were mounted onto glass slides with aqueous solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and were viewed in a Leica TCS SP5 confocal microscope system.

2.3.2. Murine tissues

Brains were sliced in coronal sections in a cryostat (30 µm thick) and collected on gelatine-coated slides. When sections were used for immunostaining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), then endogenous peroxidase was blocked by 30 min incubation at room temperature in peroxidase blocking solution (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). After several washes with PBS, sections were incubated overnight at room temperature with the following primary antibodies: (i) polyclonal goat anti- CB_2 receptor antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) used at 1/300; or (ii) monoclonal rat anti-mouse CD68 antibody (AbD Serotec, Oxford, UK) used at 1/200. Dilutions were carried out in 0.1 M potassium PBS (KPBS), pH 7.4, containing 5% normal horse serum and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chem., Madrid, Spain). After incubation, sections were washed in KPBS, followed by incubation with the corresponding biotinylated secondary antibody (1/400) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h at room temperature. Avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and DAB substrate-chromogen system (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) were used to obtain a visible reaction product. Negative control sections were obtained using the same protocol with omission of the primary antibody. A Leica DMRB microscope and a DFC300FX camera (Leica, Wetzlar, Germany) were used for the observation and photography of the slides, respectively. When sections were used for immunofluorescence analysis, they were incubated overnight at room temperature

with the following primary antibodies: (i) monoclonal rat anti-mouse CD68 antibody (AbD Serotec, Oxford, UK) used at 1/200; or (ii) monoclonal mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH) (Chemicon-Millipore, Temecula, CA, USA) used at 1/500. Next, sections were incubated with the corresponding secondary antibody, biotinylated horse anti-mouse antibody (Vector Elite, Burlingame, CA, USA), used at 1/200, followed by streptavidin incubation. We used Alexa Fluor-488 or -546 conjugated streptavidin (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Sections were then stained with 45 μ M Hoechst 33342 and the slides were coverslipped with Vectashield Mounting Medium (Vector Elite, Burlingame, CA, USA). A Leica DMRB microscope and a DFC300FX camera (Leica, Wetzlar, Germany) were used for the observations and photography of the slides, respectively. In some cases, we quantified the magnitude of CD68 or TH immunostaining either in the striatum or the substantia nigra (both ipsilateral and contralateral sides). As mentioned above, we used the NIH Image Processing and Analysis software (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA) using 4–5 randomly selected sections, separated approximately by 200 μ m, and observed with 5 \times –20 \times objectives depending on the method and the brain area under quantification. In all sections, the same area of the striatum or the substantia nigra was analyzed. Analyses were always conducted by experimenters who were blinded to all animal characteristics. Data were expressed as percentage of immunostaining in the ipsilateral (lesioned) side over the contralateral (non-lesioned) side.

2.4. Real time qRT-PCR analysis

Brain coronal slices (around 500 μ m thick) were made at levels containing the substantia nigra or the striatum, according to Palkovits and Brownstein (1988). Subsequently, the two structures were dissected and used for qRT-PCR analysis. Total RNA was isolated from dissected samples using either SurePrep RNA/Protein Purification Kit (Fisher Bioreagents, Madrid, Spain). The total amount of RNA extracted was quantitated by spectrometry at 260 nm and its purity from the ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm. After genomic DNA was removed (to eliminate DNA contamination), single-stranded complementary DNA was synthesized from up to 1 μ g of total RNA using the commercial kits Rneasy Mini Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Hilgen, Germany) and iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The reaction mixture was kept frozen at -20°C until enzymatic amplification. Quantitative RT-PCR assays were performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to quantify mRNA levels for CB₂ receptor (ref. Mm02620087_s1), TNF- α (ref. Mm00443260_g1), IL-1 β (ref. Mm00434228_m1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (ref. Mm00440502_m1), using GAPDH expression (ref. Mm99999915_g1) as an endogenous control gene for normalization. The PCR assay was performed using the 7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (7300 Fast System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

2.5. Data analysis

Data were subjected to the Student's t-test or the one-way analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls test, as required, using Graph-Pad software (version 5.0).

3. Results

3.1. CB₂ receptors are elevated in microglial cells in the substantia nigra of PD patients

Our first objective in the present study was to elucidate whether the up-regulatory response of CB₂ receptors found previously in MPTP-

intoxicated mice (Price et al., 2009) and in LPS-lesioned mice (García et al., 2011) also occurs in PD patients, an issue still unexplored, despite that a glial neuroinflammatory response has been strongly related to the initiation and the progression of neurodegeneration in this disease (Ouchi et al., 2005). To this end, we used postmortem tissues (substantia nigra) of PD patients and control subjects provided by two biobanks, which were used for analysis of CB₂ receptors, but also for Iba-1 (used as marker of microglial cells) and CD68, a glycoprotein expressed in cells of the myeloid lineage (used as marker of activated microglia, macrophages and monocytes), using immunofluorescence. In the three cases, the immunostaining found in the substantia nigra of PD patients was significantly higher compared to control subjects (Fig. 1A, C and D), in particular in the case of Iba-1 that could be quantified showing immunoreactivity levels almost 3-fold higher levels in PD patients than controls (Fig. 1B). We also conducted double-staining immunofluorescence to identify the cellular substrates in which CB₂ receptors are located in PD patients. We found that part of CB₂ receptor-positive cells in the substantia nigra of PD patients were also positive for Iba-1 (Fig. 1E), thus supporting that they are microglial cells and possibly peripheral macrophages recruited at lesioned sites. CB₂ receptor immunofluorescence was also present in cells that were not labeled with Iba-1 and that, following the data collected in other disorders, may be astrocytes (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010), although this remains to be investigated.

3.2. CB₂ receptors are also elevated in the striatum and the substantia nigra of LPS-lesioned mice

As mentioned above, parkinsonian inflammation can be reproduced experimentally in mice by intrastriatal injections of LPS (Hunter et al., 2009) and, in a previous study (García et al., 2011), we already described higher CB₂ receptor immunostaining in these mice compared to controls. In the present study and using this model, we wanted first to quantify the magnitude of such response in LPS-lesioned mice. Thus, using qRT-PCR, we found elevated levels for the CB₂ receptor in the striatum and substantia nigra of LPS-lesioned mice (Fig. 2A), and, using DAB immunostaining, we also found a significant increase in the immunoreactivity for this receptor (located apparently in glial elements given the morphological characteristics of immunolabeled cells) in the LPS-lesioned striatum compared to controls in which the immunostaining was almost negligible (Fig. 2B).

3.3. Genetic inactivation of CB₂ receptors aggravates LPS-induced inflammation

Next, we wanted to compare the extent of the LPS-induced inflammatory response in the presence or absence of CB₂ receptors. Thus, we analyzed CD68 immunostaining, which serve to identify the activation of microglia and the infiltration of peripheral macrophages that massively occur after LPS insult (Herrera et al., 2000), in the striatum and the substantia nigra of CB₂ receptor-deficient mice compared to wild-type animals. We found that the elevation of CD68 immunostaining in the lesioned striatum compared to the non-lesioned contralateral side (approximately 2–3 fold) was of similar magnitude in both genotypes (Fig. 3A and C), but important differences were found in the case of the substantia nigra (Fig. 3B and D). In this structure, the levels of CD68 immunostaining in the lesioned side of wild-type mice were relatively similar when compared to its corresponding non-lesioned contralateral side, thus indicating that LPS did not affect this structure in normal mice at least in relation with this parameter (Fig. 3B). This may find an explanation in the fact that the site for LPS injection was the striatum, not the substantia nigra, despite that previous studies did prove that the substantia nigra was also affected after LPS insult (Jung et al., 2010; Zhang et al., 2012), although one of these studies was conducted in rats, not in mice (Zhang et al., 2012) and the other used Iba-1 immunostaining instead CD68 (Jung et al., 2010). However,

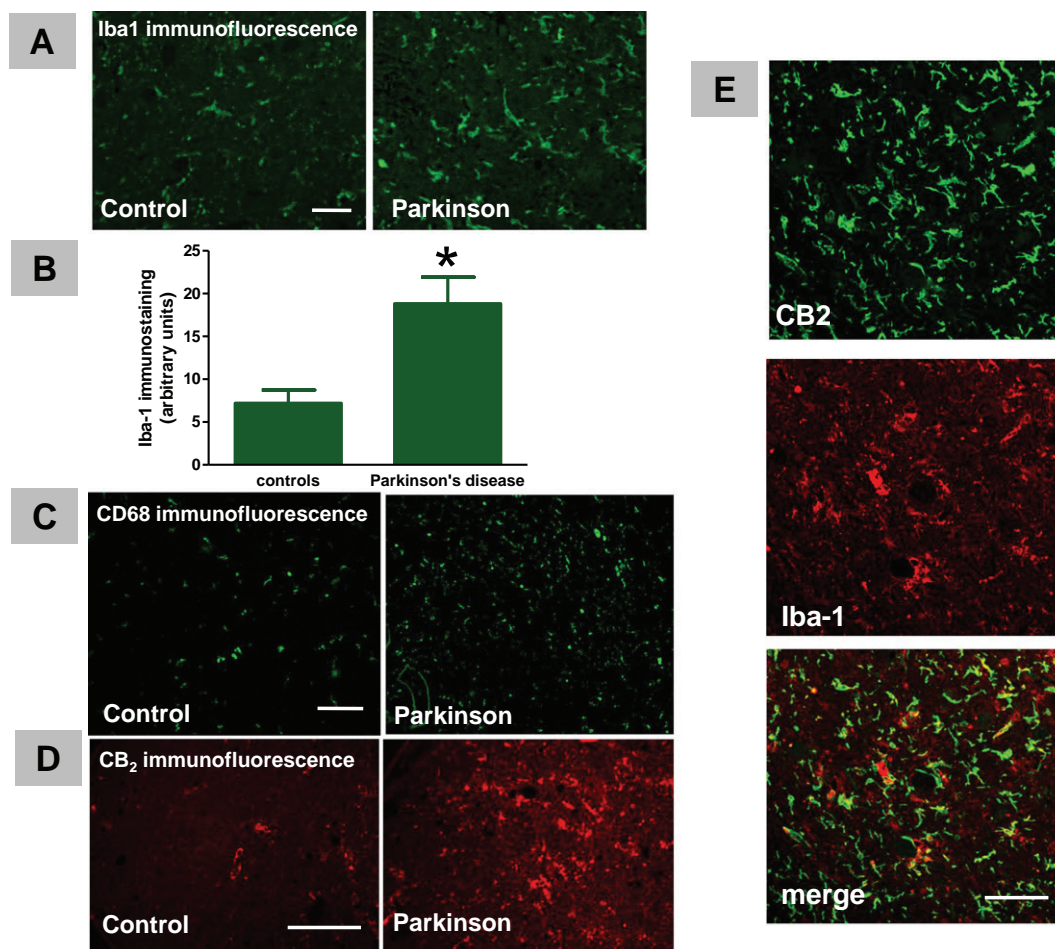


Fig. 1. A, C and D: Representative microphotographs corresponding to Iba-1, CD68 and CB₂ receptor immunofluorescence in the substantia nigra of one PD patient and one control subject (scale bar = 25 μm in panel A and scale bar = 50 μm in panels C and D). B: Quantification of Iba-1 immunofluorescence in the substantia nigra of PD patients and control subjects. Values are means ± SEM (n = 3–5 subjects per group) and the data were assessed by the Student's t-test (*p < 0.005). E: Representative double-staining microphotographs of the substantia nigra of one PD patient obtained with the anti-CB₂ receptor antibody (red fluorescence), with the anti-Iba-1 antibody (green fluorescence) and with the merged staining (scale bar = 50 μm).

we found that, in the absence of CB₂ receptors, the levels of CD68 immunostaining in the lesioned side were significantly elevated (more than 2-fold) compared to the non-lesioned contralateral structure (Fig. 3B), thus indicating that the lack of these receptors aggravates the inflammatory response elicited by LPS then facilitating that the substantia nigra may be also affected or, in other words, that the inflammation also reaches this structure. This represents a solid proof of the protective role exerted by these receptors against the inflammatory damage elicited by LPS.

3.4. Pharmacological activation of CB₂ receptors reduces LPS-induced proinflammatory responses

We also investigated the consequences of the selective activation of CB₂ receptors in LPS-lesioned mice in relation with some molecular events that have been involved in pro-inflammatory responses. First, we confirmed that the activation of CB₂ receptors with HU-308 reversed the LPS-induced elevation of CD68 immunofluorescence in the striatum and the parallel reduction in TH immunofluorescence in the substantia nigra (Fig. 4A and B). The involvement of CB₂ receptors in these effects appears to be well-demonstrated given the selectivity described for this agonist, the data found for CD68 immunostaining in CB₂ receptor-knockout and wild-type mice (Fig. 3B), and the observation that the responses to HU-308 were completely lost in CB₂ receptor-deficient mice (data not shown). LPS insult has been associated with an elevation in the generation of proinflammatory mediators, e.g. proinflammatory

cytokines and enzymes (Oh et al., 2010), also seen in experimental parkinsonism (Arimoto and Bing, 2003; Liberatore et al., 1999), a fact that we confirmed here in the striatum and, to a lesser extent, in the substantia nigra by measuring gene expression for TNF-α, IL-1β and iNOS (Fig. 5). Interestingly, the selective activation of CB₂ receptors reduced the elevated gene expression for iNOS, although exclusively in the striatum (Fig. 5A), not in the substantia nigra (Fig. 5B) presumably because of the smaller and statistically not significant ($F(2,20) = 3.384$, $p = 0.06$) induction of this enzyme by LPS in this brain area. The selective activation of CB₂ receptors also apparently attenuated some of the elevations in cytokines although only as a trend, with no statistical significance (Fig. 5A and B).

4. Discussion

There is a general consensus about the important role that CB₂ receptors play endogenously against inflammatory events typical of neurodegenerative disorders, as well as about the possibilities of a pharmacological management of this function. Apparently, this may be facilitated by the frequent up-regulatory responses elicited by these receptors in the lesioned sites in most of neurodegenerative disorders (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010). This also includes PD, although the evidence collected in this disorder is relatively limited with only two studies describing elevation in CB₂ receptors in the nigrostriatal area in response to lesions induced by MPTP (Price et al., 2009) or LPS (García et al., 2011) in mice. No data had been reported so far

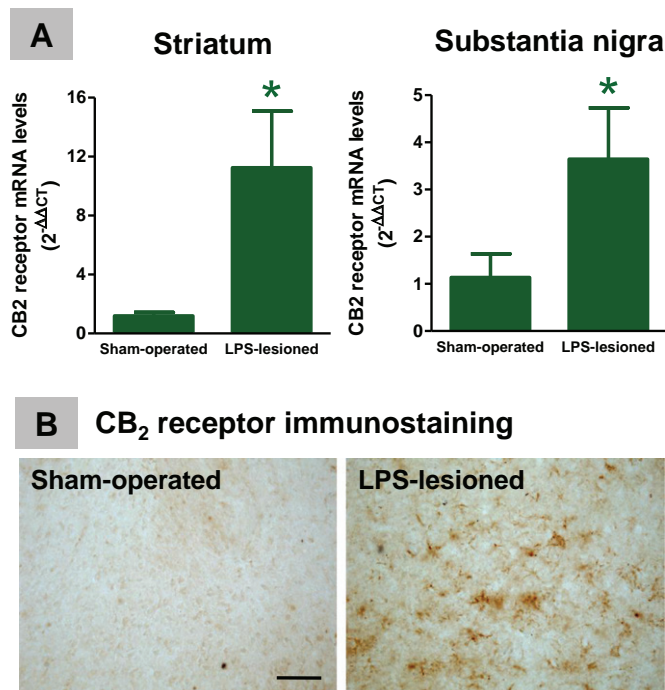


Fig. 2. A: mRNA levels for the CB₂ receptor measured by qRT-PCR in the striatum and the substantia nigra of mice at 2 weeks of being subjected to intrastriatal injections of LPS or saline (control rats). Values are means \pm SEM ($n = 7-8$ subjects per group) and the data were assessed by the Student's t -test (* $p < 0.005$). B: Representative microphotographs corresponding to DAB immunostaining for the CB₂ receptor in the striatum of LPS-lesioned and control mice (scale bar = 50 μ m).

concerning the situation in humans, so our study represents the first time that the issue is investigated in PD patients in comparison with control subjects. Our observations unequivocally indicate that the elevation of CB₂ receptors also occurs in the substantia nigra of PD patients, as well as that this response runs in parallel to an increase in the activation of microglial cells and in the infiltration of peripheral macrophages, as revealed the elevated levels of immunostaining for Iba-1 and CD68, respectively. In fact, double-staining studies strongly indicate that the up-regulation of CB₂ receptors occurs in Iba-1-positive cells that are microglial cells, which likely proliferate, are recruited and migrate to lesioned sites, and become activated in parallel to an elevation in the levels of CB₂ receptors. A similar response, elevation of CB₂ receptors in parallel to the activation of microglial cells, has been also found in postmortem tissues of other neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (Benito et al., 2003) amyotrophic lateral sclerosis (Yiangou et al., 2006), Huntington's disease (Palazuelos et al., 2009) and autosomal dominant hereditary ataxias (Rodríguez-Cueto et al., 2014). However, this is the first time that this is seen in PD patients despite that: (i) glial neuroinflammation has been strongly linked to a progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons (Ouchi et al., 2005); and (ii) epidemiological data support that the regular use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (e.g. ibuprofen) reduces the risk of developing PD (Chen et al., 2005), two facts that give an instrumental value to the control of inflammation in PD. We also identified CB₂ receptor-positive cells that were not labeled with the anti-Iba-1 antibody, a fact also found in other disorders, e.g. Huntington's disease (Palazuelos et al., 2009; Sagredo et al., 2009), and autosomal dominant hereditary ataxias (Rodríguez-Cueto et al., 2014). We assume that they are possibly activated astrocytes, but this remains to be investigated in detail, and we also assume that, given the morphological characteristics of these cells, they are not neurons. This is an important point as recent studies have also shown the CB₂ receptor to be located in certain neuronal subpopulations within the basal ganglia as the pallidothalamic

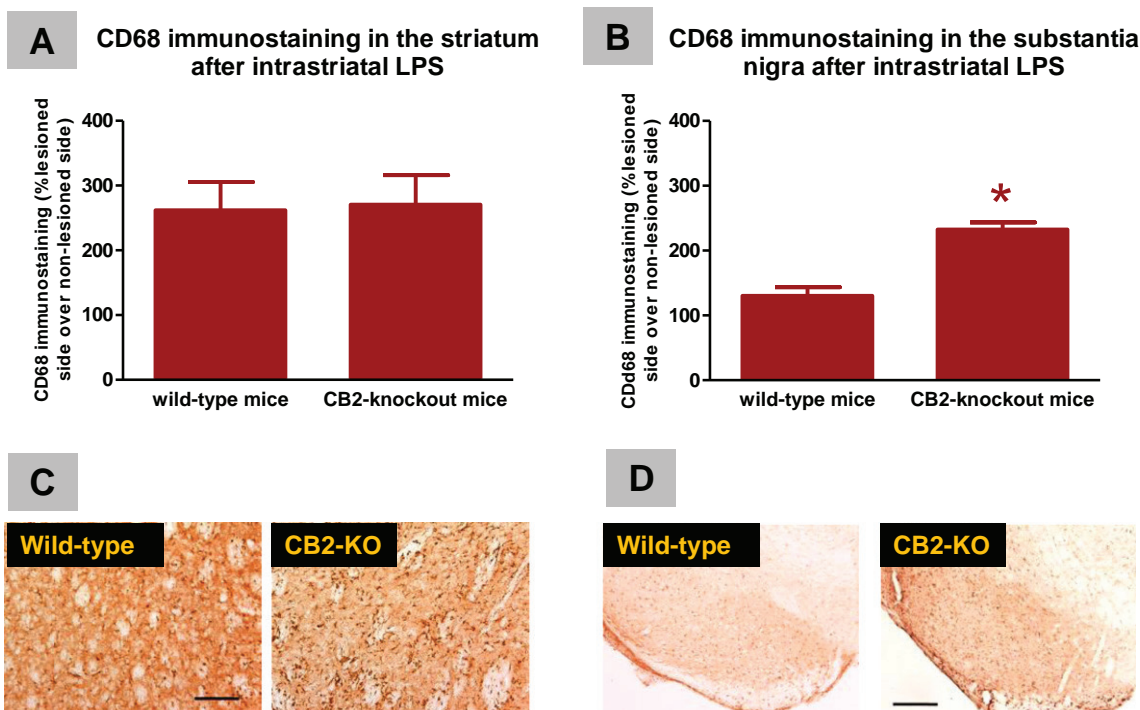


Fig. 3. A and B: Quantification of DAB immunostaining for CD68 in the striatum and the substantia nigra of CB₂ receptor-deficient and wild-type mice at 2 weeks of being subjected to intrastriatal injections of LPS. Values correspond to % of the lesioned side over the non-lesioned side and are expressed as means \pm SEM ($n = 4-8$ subjects per group). Data were assessed by the Student's t -test (* $p < 0.005$). C and D: Representative microphotographs corresponding to DAB immunostaining for CD68 in the striatum and the substantia nigra of LPS-lesioned CB₂ receptor-deficient or wild-type mice (scale bar = 25 μ m in panel C and scale bar = 250 μ m in panel D).

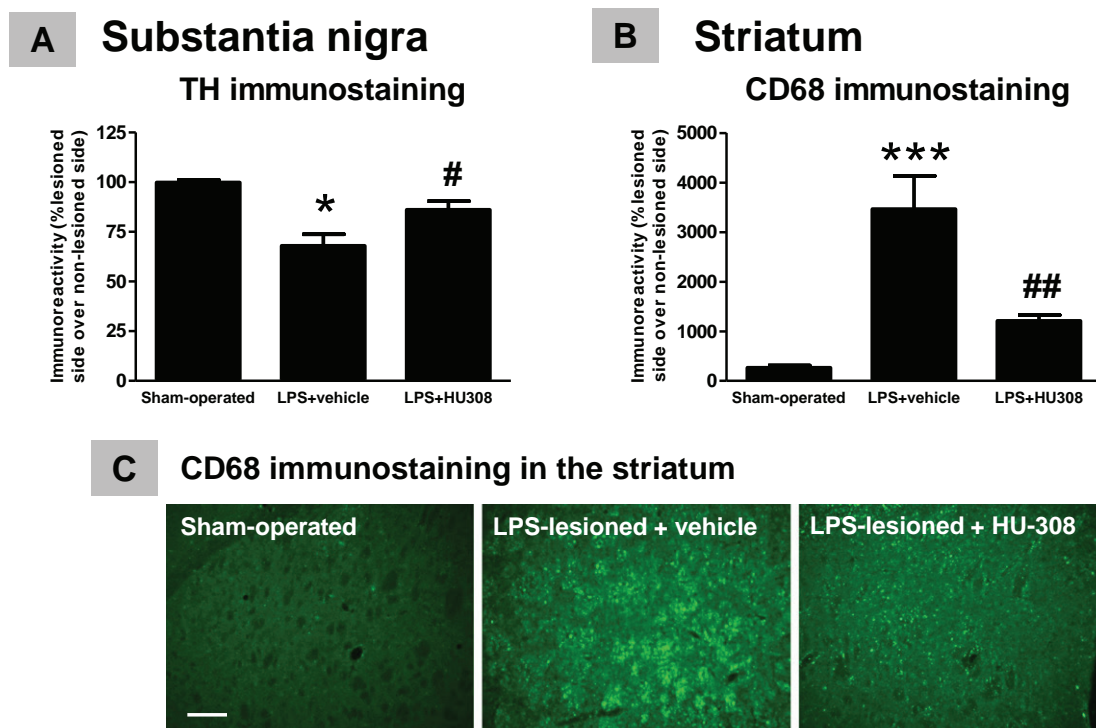


Fig. 4. A and B: Quantification of TH immunofluorescence in the substantia nigra and of CD68 immunofluorescence in the striatum of LPS-lesioned and control mice that were chronically treated with HU-308 (5 mg/kg) or saline for 2 weeks. Values correspond to % of the lesioned side over the non-lesioned side and are expressed as means \pm SEM ($n = 6$ –8 subjects *per* group). Data were assessed by the one-way analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ vs controls; # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$ vs LPS-lesioned mice treated with vehicle). C: Representative microphotographs corresponding to CD68 immunofluorescence in the striatum of LPS-lesioned and control mice that were chronically treated with HU-308 (5 mg/kg) or saline for 2 weeks (scale bar = 25 μ m).

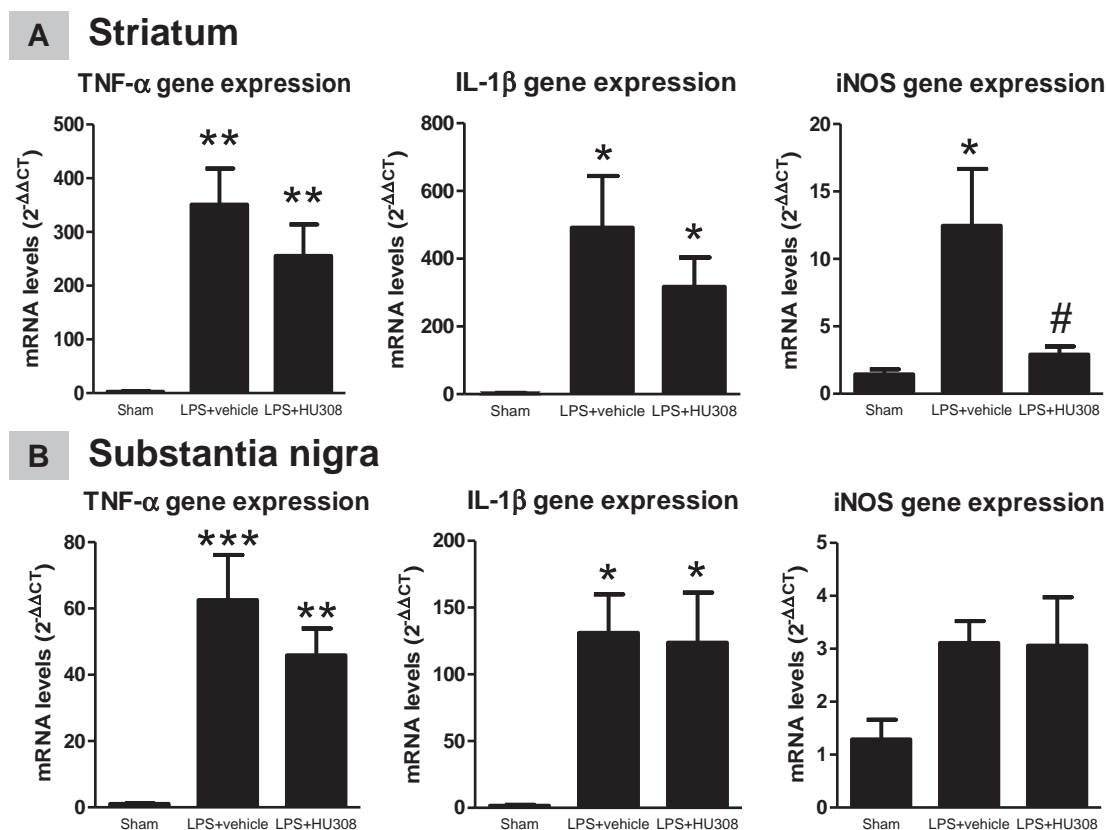


Fig. 5. A and B: mRNA levels for TNF- α , IL-1 β and iNOS in the striatum and the substantia nigra of LPS-lesioned and control mice that were chronically treated with HU-308 (5 mg/kg) or saline for 2 weeks. Values are expressed as means \pm SEM ($n = 5$ subjects *per* group). Data were assessed by the one-way analysis of variance followed by the Student–Newman–Keuls test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ vs controls; # $p < 0.05$ vs LPS-lesioned mice treated with vehicle).

neurons (Lanciego et al., 2011) and the nigrostriatal neurons (García et al., 2015), supporting a possible role of this receptor in synaptic activity, although this has not yet been conclusively demonstrated. There is no evidence that the activation of these “neuronal CB₂ receptors” may be neuroprotective in PD, although they may serve as a potential biomarker for neuronal losses experienced in this disorder. In this respect, we found that the levels of CB₂ receptors located in nigrostriatal dopaminergic neurons in the postmortem tissues of control subjects were dramatically reduced in the postmortem tissues from PD patients due to the degeneration of these neurons in the disease (García et al., 2015).

The elevation of CB₂ receptors in conditions of inflammation has been also found in the model of PD in mice generated by intrastratial lesions with LPS, a fact already described previously using immunofluorescence (García et al., 2011), but confirmed here with DAB immunostaining. We have not investigated the cellular substrates in which this response takes place, but we assume that it occurs in glial cells, in particular microglial cells, given the morphological characteristics of those CB₂ receptor-positive cells visible in DAB immunostaining, and also given the data found in human tissues here and in animal models in previous studies (Price et al., 2009). Irrespective of this cellular location, our major objective here was to quantify this response in both the striatum and the substantia nigra using qRT-PCR and we found 8–10 fold and 3–4 fold elevations, respectively. Assuming that this elevation is an endogenous protective response, an immediate consequence is that the activation of these elevated CB₂ receptors may be pharmacologically exploited to reduce inflammatory responses. This was already indicated in our previous study (García et al., 2011) in which we found that mice lacking these receptors were much more vulnerable to LPS insult in relation with the loss of nigral TH neurons, supporting the pharmacological possibilities of the activation of these receptors. Here, we further explore this issue by analyzing the inflammatory response using CD68 immunostaining as a marker. We found that a local application of LPS within the striatum caused a great elevation in CD68 immunoreactivity that extends for the whole striatal parenchyma and this response was of similar extent in wild-type mice and in animals deficient in CB₂ receptors. The lack of differences between both genotypes in the striatum appears logic given the intense inflammatory response occurring in the sites of LPS injection. However, it is interesting to note that this does not happen in the substantia nigra. Apparently, the inflammatory response in the substantia nigra of wild-type animals was relatively poor, but it is interesting that CD68 immunostaining increased markedly in this area in the case of CB₂ receptor deficient mice, confirming that the absence of these receptors makes this structure much more vulnerable and facilitates that LPS-induced lesion extends also to the substantia nigra which shows greater levels of macrophage infiltration and reactive microgliosis. It is also important to remark that the elevated CD68 immunostaining in the LPS-lesioned striatum was reversible by the activation of these receptors, which was in parallel with a lower loss of nigral TH neurons, in wild-type animals. However, the absence of these receptors in knockout mice counteracts any beneficial effect. This supports again the role of CB₂ receptors in the control of LPS-induced inflammation.

It is well-known from the information collected in other neuroinflammatory or neurodegenerative disorders that one possibility underlying the benefits obtained with compounds activating the CB₂ receptor may be the reduction of some proinflammatory mediators that are generated in conditions of gliosis and that deteriorate neuronal homeostasis (Fernández-Ruiz et al., 2007, 2010). Numerous previous studies have investigated several cytokines (e.g. TNF- α , IL-1 β) and enzymes (e.g. iNOS, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinases) because of their key role in this proinflammatory response (reviewed in Chiurchiù et al., in press). Here, we analyzed TNF- α and IL-1 β and found dramatic elevations in their gene expression after LPS in both the striatum and the substantia nigra. The activation of CB₂ receptors apparently tended to reduce these levels of gene expression, in particular in the striatum, but the changes were not statistically significant. We

also analyzed iNOS and, in this case, we did find a complete reversion of the LPS-induced elevation in gene expression for this proinflammatory enzyme in the striatum, which did not occur in the substantia nigra where the up-regulation of this enzyme was significantly lower compared with the striatum. It is important that our effects after targeting CB₂ receptors have concentrated in iNOS as this enzyme, which is expressed in microglia, plays a key role in neuroinflammatory responses occurring in PD, in patients (Knott et al., 2000) and also in experimental parkinsonism, e.g. MPTP-lesioned mice (Liberatore et al., 1999), and LPS-lesioned rats (Arimoto and Bing, 2003; Choi et al., 2009). Even, pre-clinical studies using inhibitors of iNOS have demonstrated a reduction in the degeneration of nigral dopaminergic neurons (Choi et al., 2009), so that the issue is susceptible to be pharmacologically exploited. In this respect, it is important to remark that dopaminergic neurons have been found to be particularly susceptible to nitric oxide generated by iNOS, which explains the impact of its up-regulatory response in conditions of neuroinflammation and its relevance as a potential pharmacological target in PD (Antunes et al., 2002). The fact that the activation of CB₂ receptors is followed by a strong reduction in the generation of iNOS may be extremely relevant in this context.

In conclusion, we have provided the first evidence on the up-regulation of CB₂ receptors in glial elements in postmortem tissues of PD patients, which has been confirmed and quantified in an inflammatory model of this disease. In addition, we have provided evidence on the benefits derived from their activation in relation with the activation of microglial cells, the infiltration of macrophages and the capability of these cells to generate proinflammatory factors.

Conflict of interest

The authors declare that they do not have any conflict of interest.

Authors' contribution

CG supervised and conducted all immunolabeling procedures. YGG and CPG conducted the experiments with animals including the pharmacological treatments. YGG also conducted the qRT-PCR analysis. JFR designed and coordinated the whole study, and analyzed the data with CG. JFR prepared the manuscript for submission, which was approved by all authors.

Acknowledgments

This work has been supported by grants from CIBERNED (CB06/05/0089), MINECO (SAF2009/11847; SAF2012/39173) and CAM (S2011/BMD-2308). These agencies had no further role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. Authors are indebted to the biobanks of the “Fundación CIEN”, Madrid, Spain, and of the “Banc de Teixits Neurològics, Universitat de Barcelona-Hospital Clínic”, Barcelona, Spain, for providing the human tissues used in these studies, as well as to Yolanda García-Movellán for administrative assistance.

References

- Antunes F, Han D, Rettori D, Cadenas E. Mitochondrial damage by nitric oxide is potentiated by dopamine in PC12 cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1556:233–8.
- Arimoto T, Bing G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 2003;12:35–45.
- Benito C, Nuñez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB₂ receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 2003;23:11136–41.
- Buckley NE. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br J Pharmacol* 2008;153:309–18.
- Buckley NE, McCoy KL, Mezey E, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, et al. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB₂ receptor. *Eur J Pharmacol* 2000;396:141–9.

- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, et al. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2004;65:999–1007.
- Chen H, Jacobs E, Schwarzschild MA, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 58:963–7.
- Chiurchiù V, Leuti A, Maccarrone M. Cannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases: a melting pot for the regulation of brain immune responses. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015. (in press).
- Choi DY, Liu M, Hunter RL, Cass WA, Pandya JD, Sullivan PG, et al. Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. *PLoS One* 2009;4:e5482.
- Chung YC, Bok E, Huh SH, Park JY, Yoon SH, Kim SR, et al. Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation. *J Immunol* 2011;187:6508–17.
- de Lago E, Moreno-Martet M, Cabranes A, Ramos JA, Fernández-Ruiz J. Cannabinoids ameliorate disease progression in a model of multiple sclerosis in mice, acting preferentially through CB1 receptor-mediated anti-inflammatory effects. *Neuropharmacology* 2012;62:2299–308.
- Duarte JM, Ferreira SG, Carvalho RA, Cunha RA, Köfalvi A. CB₂ receptor activation inhibits neuronal and astrocytic intermediary metabolism in the rat hippocampus. *Neurochem Int* 2012;60:1–8.
- Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB₂ receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:39–45.
- Fernández-Ruiz J, García C, Sagredo O, Gómez-Ruiz M, de Lago E. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:387–404.
- Fidaleo M, Fanelli F, Ceru MP, Moreno S. Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) and its lipid ligands. *Curr Med Chem* 2014;21:2803–21.
- García C, Palomo-Garó C, García-Arencibia M, Ramos J, Pertwee R, Fernández-Ruiz J. Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 2011;163:1495–506.
- García MC, Cincina V, Palomo-Garó C, Rábano A, Fernández-Ruiz J. Identification of CB₂ receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2015;587:1–4.
- García-Arencibia M, González S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernández-Ruiz J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res* 2007;1134:162–70.
- Herrera AJ, Castaño A, Venero JL, Cano J, Machado A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. *Neurobiol Dis* 2000;7:429–47.
- Hisano S, Haga H, Miyamoto K, Takeda E, Fukui Y. The basic amino acid transporter (rBAT)-like immunoreactivity in paraventricular and supraoptic magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res* 1996;710:299–302.
- Hunter RL, Cheng B, Choi DY, Liu M, Liu S, Cass WA, et al. Intrastratial lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice. *J Neurosci Res* 2009;87:1913–21.
- Jung BD, Shin EJ, Nguyen XK, Jin CH, Bach JH, Park SJ, et al. Potentiation of methamphetamine neurotoxicity by intrastratial lipopolysaccharide administration. *Neurochem Int* 2010;56:229–44.
- Knott C, Stern G, Wilkin GP. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:724–39.
- Lanciego JL, Barroso-Chinea P, Rico AJ, Conte-Perales L, Callén L, Roda E, et al. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. *J Psychopharmacol* 2011;25:97–104.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 1999;5:1403–9.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, et al. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci* 2003;23: 6470–4.
- Oh YT, Lee JY, Lee J, Lee JH, Kim JE, Ha J, et al. Oleamide suppresses lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 through inhibition of NF κ B activation in BV2 murine microglial cells. *Neurosci Lett* 2010;474:148–53.
- Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005;57:168–75.
- Palazuelos J, Aguado T, Pazos MR, Julien B, Carrasco C, Resel E, et al. Microglial CB₂ cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. *Brain* 2009;132:3152–64.
- Palkovits M, Brownstein J. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier; 1988.
- Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernández E, et al. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2009;29:2177–86.
- Rodríguez-Cueto C, Benito C, Fernández-Ruiz J, Romero J, Hernández-Gálvez ML, Gómez-Ruiz M. Changes in CB₁ and CB₂ receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias. *Br J Pharmacol* 2014;171:1472–89.
- Sagredo O, González S, Aroyo I, Pazos MR, Benito C, Lastres-Becker I, et al. Cannabinoid CB₂ receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. *Glia* 2009;57:1154–67.
- Sheng WS, Hu S, Ni HT, Rock RB, Peterson PK. WIN55,212-2 inhibits production of CX3CL1 by human astrocytes: involvement of p38 MAP kinase. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009;4:244–8.
- Smith SR, Terminelli C, Denhardt G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:136–50.
- Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 2010;58:1017–30.
- Terrianov A, Pérez-Ortiz JM, Solesio ME, García-Gutiérrez MS, Ortega-Alvaro A, Navarrete F, et al. Overexpression of CB₂ cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine. *Neurobiol Aging* 2012;33. [421 e1–e16].
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, et al. Non-psychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 2003;23:1398–405.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, et al. COX-2, CB₂ and P2X₇-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 2006; 6:12.
- Zhang F, Zhou H, Wilson BC, Shi JS, Hong JS, Gao HM. Fluoxetine protects neurons against microglial activation-mediated neurotoxicity. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18: S213–7.



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yphrs

Targeting the cannabinoid CB₂ receptor to attenuate the progression of motor deficits in LRRK2-transgenic mice



Cristina Palomo-Garo^{a,b,c}, Yolanda Gómez-Gálvez^{a,b,c,2}, Concepción García^{a,b,c,*,1},
Javier Fernández-Ruiz^{a,b,c,*,1}

^a Instituto Universitario de Investigación en Neuroquímica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, Madrid, Spain

^c Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2016

Received in revised form 13 March 2016

Accepted 3 April 2016

Available online 6 April 2016

Keywords:

Cannabinoids

Endocannabinoid signaling system

CB₂ receptors

Parkinson's disease

LRRK2-transgenic mice

Autophagy

ABSTRACT

Most of cases of Parkinson's disease (PD) have a sporadic origin, with their causes mostly unknown, although overexposure to some environmental factors has been found to occur in some cases. Other forms of parkinsonism are the consequence of dominant or recessive mutations in specific genes, e.g. α -synuclein, parkin and, more recently, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), whose G2019S mutation represents the most prevalent form of late-onset, autosomal dominant familial PD. A transgenic mouse model expressing the G2019S mutation of LRRK2 is already available and apparently may represent a valuable experimental model for investigating PD pathogenesis and novel treatments. We designed a long-term study with these animals aimed at: (i) elucidating the changes experienced by the endocannabinoid signaling system in the basal ganglia during the progression of the disease in these mice, paying emphasis in the CB₂ receptor, which has emerged as a promising target in PD, and (ii) evaluating the potential of compounds selectively activating this CB₂ receptor, as disease-modifying agents in these mice. Our results unequivocally demonstrate that LRRK2 transgenic mice develop motor impairment consisting of small anomalies in rotarod performance (presumably reflecting a deficit in motor coordination and dystonia) and a strong deficiency in the hanging-wire test (reflecting muscle weakness), rather than hypokinesia which was difficult to be demonstrated in the actimeter. These behavioral responses occurred in absence of any evidence of reactive gliosis and neuronal losses, as well as synaptic deterioration in the basal ganglia, except an apparent impairment in autophagy reflected by elevated LAMP-1 immunolabelling in the striatum and substantia nigra. Furthermore, there were no changes in the status of the CB₂ receptor, as well as in other elements of the endocannabinoid signaling, in the basal ganglia, but, paradoxically, the selective activation of this receptor partially reversed the deficits in the hanging-wire test of LRRK2 transgenic mice. This was accompanied by normalization in LAMP-1 immunolabelling in the basal ganglia, although it is possible that other CNS structures, remaining to be identified, are involved in the behavioral improvement. In summary, our data support the interest of the CB₂ receptor as a potential pharmacological target in LRRK2 transgenic mice, although the neuronal substrates underlying these benefits might be not completely related to the basal ganglia and to the presumed parkinsonian features of these mice.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cannabinoids have demonstrated promising anti-inflammatory properties that may serve to preserve neuronal function and integrity in different neuroinflammatory and neurodegenerative disorders [1]. The cannabinoid type-2 (CB₂) receptor has been found to preferentially mediate these effects [2], although recent studies also suggest a role for the cannabinoid type-1 (CB₁) receptor [3] and even for the peroxisome proliferator-activated receptor

* Corresponding authors at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: conchig@med.ucm.es (C. García), jjfr@med.ucm.es (J. Fernández-Ruiz).

¹ Both authors share the last position and the corresponding authorship.

² Present address: Keele University, Institute for Science and Technology in Medicine, Newcastle under Lyme, Staffordshire, United Kingdom.

(PPAR) family [4]. The anti-inflammatory function of CB₂ receptors appears to be facilitated by the presence of these receptors in glial elements within the CNS, mainly astrocytes and microglial cells, and the up-regulatory response that they frequently experience when these cells become reactive due to inflammatory, excitotoxic, oxidative or infectious insults [2]. In the case of astrocytes, the benefits provided by cannabinoids appear to be associated with the trophic role exerted by these glial cells, including: (i) improvements in the supply of lactate, ketone bodies and other metabolic substrates to neurons [5]; (ii) the generation of neurotrophins or anti-inflammatory/pro-survival mediators (e.g. interleukin-10 (IL-10), IL-1 receptor antagonists, transforming growth factor- β (TGF- β)) that could potentially rescue damaged neurons [6,7]; and/or (iii) the inhibition in the production of fractalkine and other chemokines [8]. These effects in astrocytes possibly involve a concerted action of both CB₁ and CB₂ receptors in conditions of brain damage. By contrast, the effects of cannabinoids in microglial cells are much more dependent on the CB₂ receptor function. These receptors play an important role in the proliferation and migration of these cells at lesion sites [9], and they can also dampen the generation of a variety of neurotoxic factors (e.g. tumor necrosis factor- α (TNF- α)) by these cells [2]. All this experimental evidence situates the CB₂ receptor located in reactive microglia and in activated astrocytes in a promising position for being used as a target to provide neuroprotection [2].

An important advantage of those cannabinoids selectively targeting the CB₂ receptor is that they do not provoke the frequent psychotropic side effects seen after the activation of the CB₁ receptor, supporting the idea that they are safe and well-tolerated for clinical applications. It is also important to remark that the activation of CB₂ receptors may be the best way to reproduce the endogenous response associated with the above-mentioned elevation of these receptors in activated astrocytes and, in particular, reactive microglia in response to inflammatory, excitotoxic and traumatic insults. Such response has been found to occur in most of neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease, Huntington's chorea, amyotrophic lateral sclerosis and others [2], but it remained elusive in Parkinson's disease (PD) up to 2009. In that year, Price et al. [10] described an elevation of CB₂ receptors in microglial cells recruited at the lesioned basal ganglia in mice intoxicated with MPTP, a classic PD model but with a modest glial response. These authors found that targeting these receptors reduced the damage of nigrostriatal neurons [10]. We recently described that such elevation of CB₂ receptors in microglial cells also occurs in patients as revealed immunohistochemical studies in postmortem tissues [11]. We also investigated the issue in an inflammatory model of nigrostriatal damage consisting in intrastriatal injection of lipopolysaccharide (LPS) and found: (i) elevated levels of CB₂ receptors in the striatum and the substantia nigra of LPS-lesioned mice, although we did not investigate the cell substrates in which this response is occurring [11,12]; (ii) that CB₂ receptor-deficient mice were more vulnerable to LPS lesion than wild-type animals, a fact reflected in higher losses of tyrosine hydroxylase (TH)-containing neurons [12] and enhanced Cd68 immunostaining [11]; and (iii) that the selective activation of CB₂ receptors in LPS-lesioned mice attenuated such responses [11,12] and also the elevation in proinflammatory mediators such as cytokines and inducible nitric oxide synthase [11]. In a recent study, Concannon et al. [13] confirmed the elevation of CB₂ receptors in LPS-lesioned rats which was paralleled by an increase in microglial activation. It is interesting that similar genetic, biochemical and pharmacological studies conducted in rodents lesioned with 6-hydroxydopamine, which causes a poor inflammatory response, did not show so clearly the up-regulatory response of the CB₂ receptor [12,13], although other authors described that mice overexpressing CB₂ receptors were more protected against

6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal damage [14]. Therefore, the evidence collected so far supports that CB₂ receptor may be also a promising pharmacological target in PD, although more specifically in those conditions having greater glial activation and inflammatory events.

It is important to remark that this issue has been investigated exclusively in neurotoxin-based models of PD, as most of cases of this disease have a sporadic origin, with causes mostly unknown [15] although, in some cases, due to overexposure to certain medicines (e.g. dopaminergic antagonists) or to environmental toxicity, e.g. pesticides. However, some forms of parkinsonism are the consequence of dominant or recessive mutations in specific genes, e.g. α -synuclein, parkin and, more recently, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), the causal gene for PARK8 type PD, whose G2019S mutation represents the most prevalent form of late-onset, autosomal dominant familial PD [16,17]. LRRK2 gene encodes a complex protein with several protein interaction motifs and two enzymatically-active domains [18]. Interestingly, LRRK2 has been related to glial-derived inflammatory responses [19–21], given its high expression in microglia [22], although it is also present in neurons and astrocytes. However, its function in these cells and, in general, its physiological substrates remain to be identified with some candidates presently under investigation, including β -tubulin and other cytoskeleton-related proteins [23], as well as some kinases such as Akt1 [24], different mitogen-activated kinase kinases [25] and LRRK2 autophosphorylation [26].

The fact that LRRK2 is highly linked to microglial function makes interesting to investigate the CB₂ receptor, which is up-regulated in reactive microglia in PD [10,11], in models of this disease based on LRRK2 mutations. In this sense, transgenic mice expressing the G2019S mutation of LRRK2 are already available [27,28], then apparently representing a valuable experimental model for investigating PD pathogenesis and novel treatments. However, it is important to remark that most of mutant LRRK2 transgenic mouse models show little or no obvious degeneration of dopaminergic neurons. We designed a long-term study with these animals aimed at: (i) elucidating the changes experienced by the endocannabinoid signaling system in the basal ganglia during the progression of the disease in these mice, paying emphasis in the CB₂ receptor because of its previously described relevance as a novel disease-modifying therapy in PD; and (ii) evaluating the potential of cannabinoids that selectively target the CB₂ receptor as disease-modifying agents in these mice. Our data support the efficacy of such CB₂ receptor-selective cannabinoids in LRRK2 transgenic mice, although the identification of all cellular and molecular substrates that facilitate such effects would possibly need additional investigation.

2. Results

2.1. Neurological and neuropathological characterization of LRRK2-transgenic mice

The first objective of our study was the neurological and neuropathological characterization of these LRRK2 transgenic mice, given the scarce information available on transgenic models based on the G2019S mutation of LRRK2 [27,29]. We expected to confirm that the first parkinsonian-like deficits may appear at the age of 12 months, or even earlier, reaching a maximum at the age of 18 months when the damage of nigrostriatal neurons should be visible, as seen previously [27,28], so that 12 months should be the age at which the neuroprotective treatment with CB₂ receptor ligands should be initiated. To this end, we evaluated LRRK2-transgenic and wild-type mice for possible behavioral anomalies in a series of motor tests starting at the age of 6 months till to 18 months after birth. Before, it is important to remark that we also recorded the

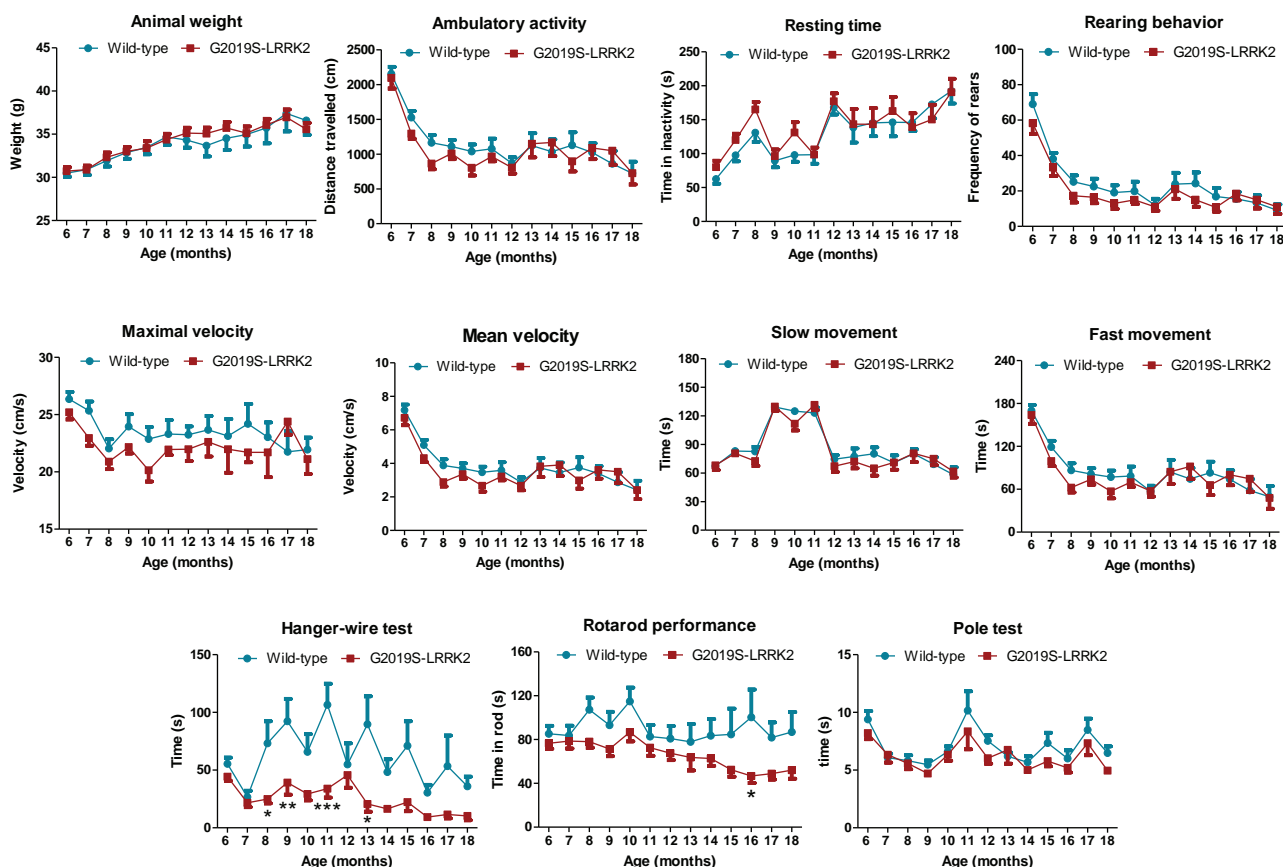


Fig. 1. Analysis of animal weight and different behavioral responses related to potential motor deficits measured in the hanging-wire, pole and rotarod tests, and in a computer-aided actimeter in LRRK2 transgenic and wild-type male mice at different ages after birth. Values are means \pm SEM ($n = 7-8$ subjects per group) and the data were assessed by the two-way analysis of variance followed by the Bonferroni test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ versus wild-type mice).

weight gain in both genotypes but we did not find any differences between LRRK2 transgenic and wild-type mice (Fig. 1). The most powerful behavioral effect was the reduction in the hanging-wire test in LRRK2 transgenic mice, which was evident from the first ages analyzed (8 months of age) and maintained during the whole period examined (Fig. 1; genotype variable: $F(1,268) = 49.97$, $p < 0.0001$). This reduction likely reflects muscle weakness in LRRK2 transgenic mice. We also found that LRRK2 transgenic mice presented a deficient rotarod performance with shorter times in the rod that were also evident from the first ages analyzed (8 months of age). The shorter times in the rod were maintained during the whole period examined, although the maximal reduction was obtained when animals were 16 months of age (Fig. 1; genotype variable: $F(1,293) = 31.88$, $p < 0.0001$). This reduction presumably reflects a deficit in motor coordination and possibly dystonia, which apparently were also evident in the response (lower time in the pole) exhibited by LRRK2 transgenic mice in the pole test (Fig. 1; genotype variable: $F(1,293) = 6.176$, $p < 0.05$), although the extent of this reduction was much more limited as reflected the fact that, for each age, the comparison of LRRK2 transgenic and wild-type mice with the Bonferroni test did not reach statistical significance in any case (Fig. 1). We also analyzed the animals in a computer-aided actimeter which should provide information on those aspects of locomotor activity (e.g. hypokinesia) much more close to the expected parkinsonian phenotype. However, our analysis did not provide any evidence that LRRK2 transgenic mice behave in this test in a manner significantly different compared to wild-type animals, as reflected the equivalent patterns shown by both genotypes in relation with the ambulatory activity, resting time, time in slow or fast movements and mean velocity spent in ambulation (Fig. 1).

These data were similar to those described by Ramonet et al. [27], although these authors did conduct such analyses only up to the age of 15 months after birth. In our analyses, some parameters measured in the computer-aided actimeter reached statistical significance in the two-way ANOVA for the variable genotype, but such differences were not seen for each age with the Bonferroni test. This happened with the frequency of rearing behavior (Fig. 1; $F(1,294) = 4.242$, $p < 0.05$) and maximal velocity in ambulation (Fig. 1; $F(1,294) = 8.215$, $p < 0.005$).

We have also analyzed the basal ganglia of LRRK2 transgenic mice to determine the magnitude of nigrostriatal damage at three representative ages: 6, 12 and 18 months after birth. We conducted first TH immunostaining in the substantia nigra and found similar immunoreactivity in LRRK2-transgenic and wild-type mice at these three ages (Fig. 2A and B), despite the data published by Ramonet et al. [27] who did find a loss of dopaminergic neurons in these mice at 19–20 months. It is important to remark that they used a stereological procedure to detect the losses of TH-positive neurons and found a small reduction (approximately 18%), which it is unlikely that we may observe with our TH immunostaining. In fact, these authors accepted that their effect on TH-containing neurons was too modest to elicit any motor impairment [27]. Studies with other murine models based on the G2019S mutation of LRRK2 also proved no changes in the number of TH-positive neurons in the basal ganglia [30,31]. In our study, similar immunostaining were also found for Iba-1, a marker of microglial cells, in the striatum and the substantia nigra of both genotypes also analyzed at 6, 12 and 18 months after birth (Fig. 2A and B), whereas Ramonet et al. [27] analyzed astrogliosis with GFAP and also found equivalent immunolabelling in LRRK2 transgenic and wild-type mice. It is important to remark

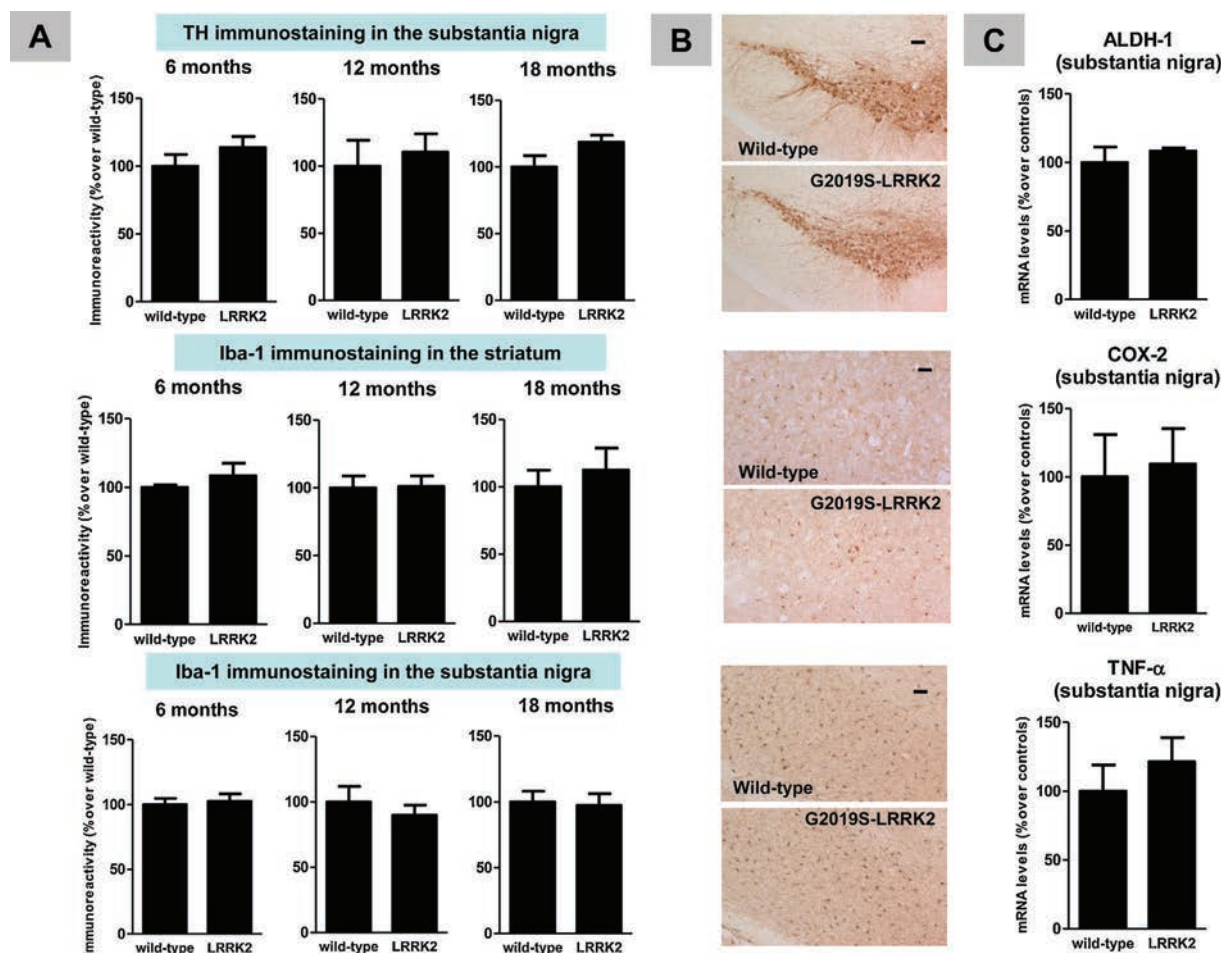


Fig. 2. A: DAB immunostaining for TH in the substantia nigra and Iba-1 in the striatum and the substantia nigra of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 6, 12 and 18 months after birth. Values correspond to % over the wild-type animals and are expressed as means \pm SEM ($n=6-8$ subjects per group). Data were assessed by the Student's t -test. B: Representative microphotographs corresponding to TH and Iba-1 immunostaining in the substantia nigra and Iba-1 immunostaining in the striatum of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 18 months after birth (scale bar = 100 μ m for TH immunostaining and scale bar = 50 μ m for Iba-1 immunostaining). C: mRNA levels for ALDH1, COX-2 and TNF- α measured by qRT-PCR in the substantia nigra of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 18 months after birth. Values correspond to % over the wild-type animals and are expressed as means \pm SEM ($n=6-8$ subjects per group). Data were assessed by the Student's t -test.

that our immunostainings were quantified for all markers and the data normalized as% over the corresponding wild-type group for each age, so that the data were assessed by the Student's t -test. The reason to proceed in this way was that each age was analyzed in separate experiments during the weeks after the samples were collected for each time-point, and not all together in the same batch given the long differences in age (one year) from the first time-point to the last one. Therefore, we assume that the behavioral responses found in the rotarod and, in particular, in the hanging-wire test in LRRK2 transgenic mice occurred in absence of any detectable evidence of reactive gliosis and neuronal injury in the basal ganglia.

Given that our immunolabelling procedure did not detect any losses of nigrostriatal neurons at the expected time-points (12–18 months), whereas the data published previously [27,28], which were conducted with stereological techniques, only detected small reductions, we assumed that possibly these LRRK2 transgenic mice may serve more as a model of early parkinsonism. In fact, such possibility has been claimed by Chou et al. [29], also working with LRRK2 transgenic mice based on the G2019S mutation. These authors also found motor deficits in their mice with only signs of neuronal dysfunction and in absence of degeneration of the nigrostriatal neurons [29]. Thus, we attempted to identify changes in possible markers of early parkinsonism (e.g. ALDH-1 [32,33]) or in factors (e.g. COX-2, TNF- α) that have been found to be instru-

mental in the development of parkinsonism [34,35]. However, we did not find any differences between LRRK2 transgenic and wild-type mice in gene expression in the substantia nigra for these three markers, ALDH-1, COX-2 and TNF- α , at 18 months of age (Fig. 2C), that might indicate a possible synaptic deterioration in the basal ganglia of mutant LRRK2 mice. An alternative may be the analysis of dopamine, but the previous study by Ramonet et al. [27] demonstrated that the levels of this neurotransmitter and its metabolites were similar in the striatum of LRRK2 transgenic and wild-type mice. With the same purpose to find potential changes representing signs of early parkinsonism, we next analyzed the basal ganglia of 18 month-old LRRK2-transgenic mice for possible alterations in markers of autophagy. This process has been found to be involved, not only in the clearance of protein aggregates and injured mitochondria in intermediate and advanced stages of the disease, but also in regulating synaptic structure and function in early phases [36], including cases produced by mutations in LRRK2 gene [37]. In fact, the study by Ramonet et al. [27] described autophagic abnormalities in LRRK2 transgenic mice at the age of 17–18 months. In our case, we found an elevation in the immunostaining for LAMP-1 in both the striatum and the substantia nigra (Fig. 3A and B), which may indicate an enhanced autophagic response in these animals. Our immunostaining data were similar to those published by Hockey

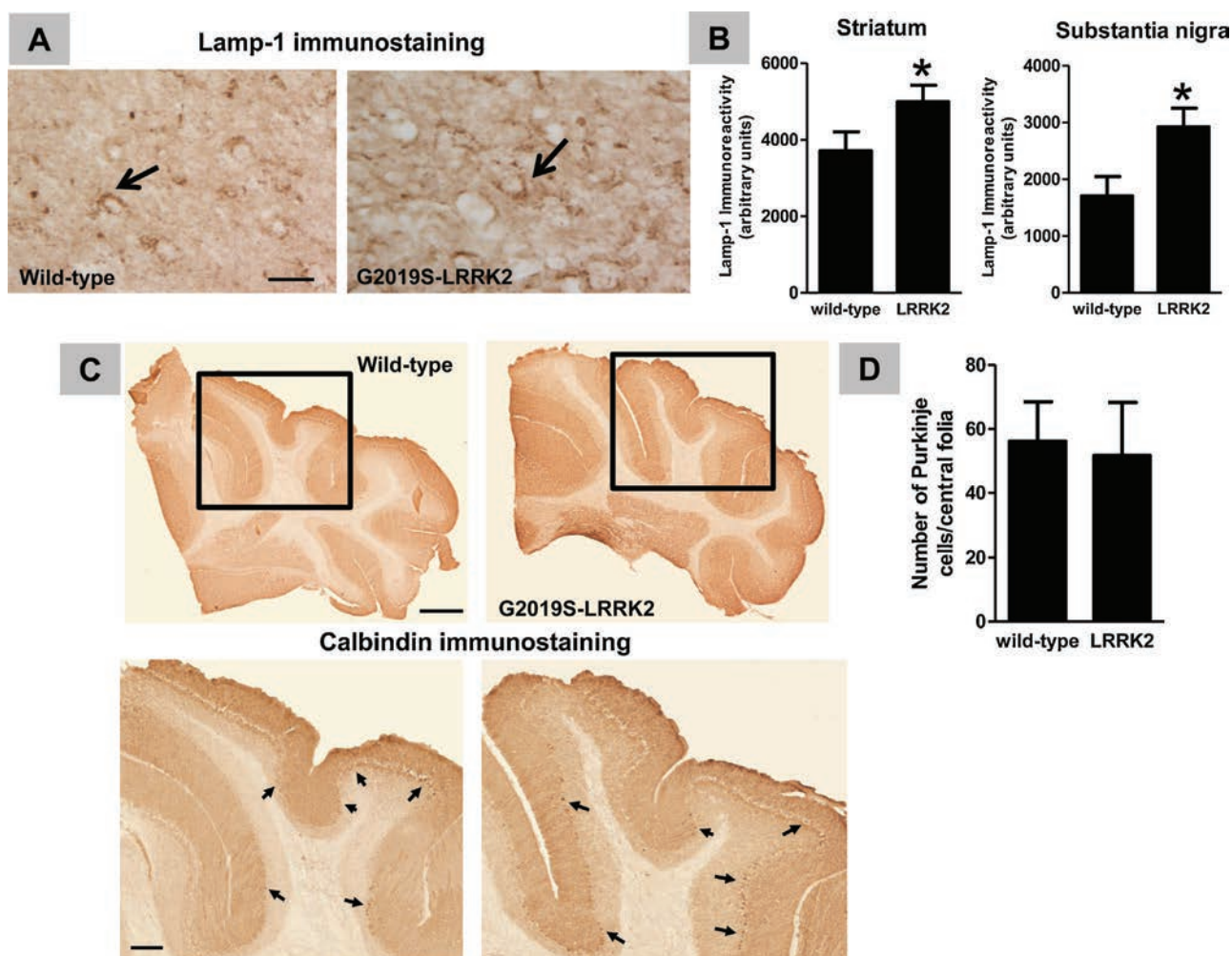


Fig. 3. A: Representative microphotographs corresponding to DAB immunostaining for the autophagy-related protein LAMP-1 in the striatum of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 18 months after birth. Arrows indicate LAMP-1-positive cells (scale bar = 25 μ m). B: Quantification of LAMP-1 immunostaining expressed as arbitrary units. Values are expressed as means \pm SEM ($n = 6$ –8 subjects *per* group). Data were assessed by the Student's *t*-test (* $p < 0.05$). C: Representative microphotographs corresponding to DAB immunostaining for calbindin used as a marker for Purkinje cells in the cerebellum of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 18 months after birth. Arrows indicate the Purkinje cells labelled with calbindin (scale bar = 500 μ m and 200 μ m, respectively). D: Quantification of calbindin immunostaining expressed as number of immunolabelled cells/central folia. Values are expressed as means \pm SEM ($n = 4$ subjects *per* group). Data were assessed by the Student's *t*-test.

et al. [37], who also found elevated LAMP-1 immunolabelling in fibroblasts obtained from PD patients having the G2019S mutation of LRRK2 gene.

We also hypothesized that CNS structures other than the basal ganglia may be involved in behavioral changes found in LRRK2 transgenic mice. An area of interest may be the cerebellum, as alterations in rotarod performance and in hanging-wire responses have been identified in mice having cerebellar atrophy, e.g. experimental models of autosomal-dominant hereditary ataxias [38]. Moreover, a recent study has demonstrated the involvement of LRRK2-mediated events in the loss of cerebellar Purkinje neurons and the development of motor incoordination in laboratory animals [39]. Then, we conducted immunostaining for calbindin, a marker of Purkinje neurons, but we could not collect any evidence that they are affected in 18 month-old LRRK2 transgenic mice (Fig. 3C and D).

2.2. Evaluation of the endocannabinoid signaling in the basal ganglia of LRRK2-transgenic mice

The second objective of our study was to investigate the changes experienced by key elements of the endocannabinoid signaling, in particular the CB₂ receptor, during the progression of the pathological phenotype in LRRK2 transgenic mice. To this end, we collected

the striatum, the globus pallidus and the substantia nigra in these animals at 6, 12 and 18 months after birth. These samples were used first to quantify, using qRT-PCR, the expression of the CB₂ receptor and the FAAH and MAGL enzymes) and, in the case of important changes, to continue with western blotting or immunostaining for these markers in those ages having the more relevant alterations. However, our qRT-PCR analyses did not prove any differences in gene expression in the three basal ganglia structures for the three endocannabinoid elements, at any of the three ages investigated, between LRRK2-transgenic and wild-type mice (Fig. 4A–C), except a weak increase found in MAGL gene expression in the substantia nigra at 6 months after birth (Fig. 4C).

2.3. Treatment with compounds targeting the CB₂ receptor in LRRK2-transgenic mice

The last objective of this study was to evaluate whether a selective activation of the CB₂ receptor may be effective in attenuating the behavioral abnormalities found in LRRK2 transgenic mice, in particular, the strong differences in hanging-wire responses reflecting animal deficits in motor strength. To this end, we treated LRRK2 transgenic animals with the selective CB₂ receptor agonist HU-308 and confirmed that its effects were CB₂ receptor-mediated by

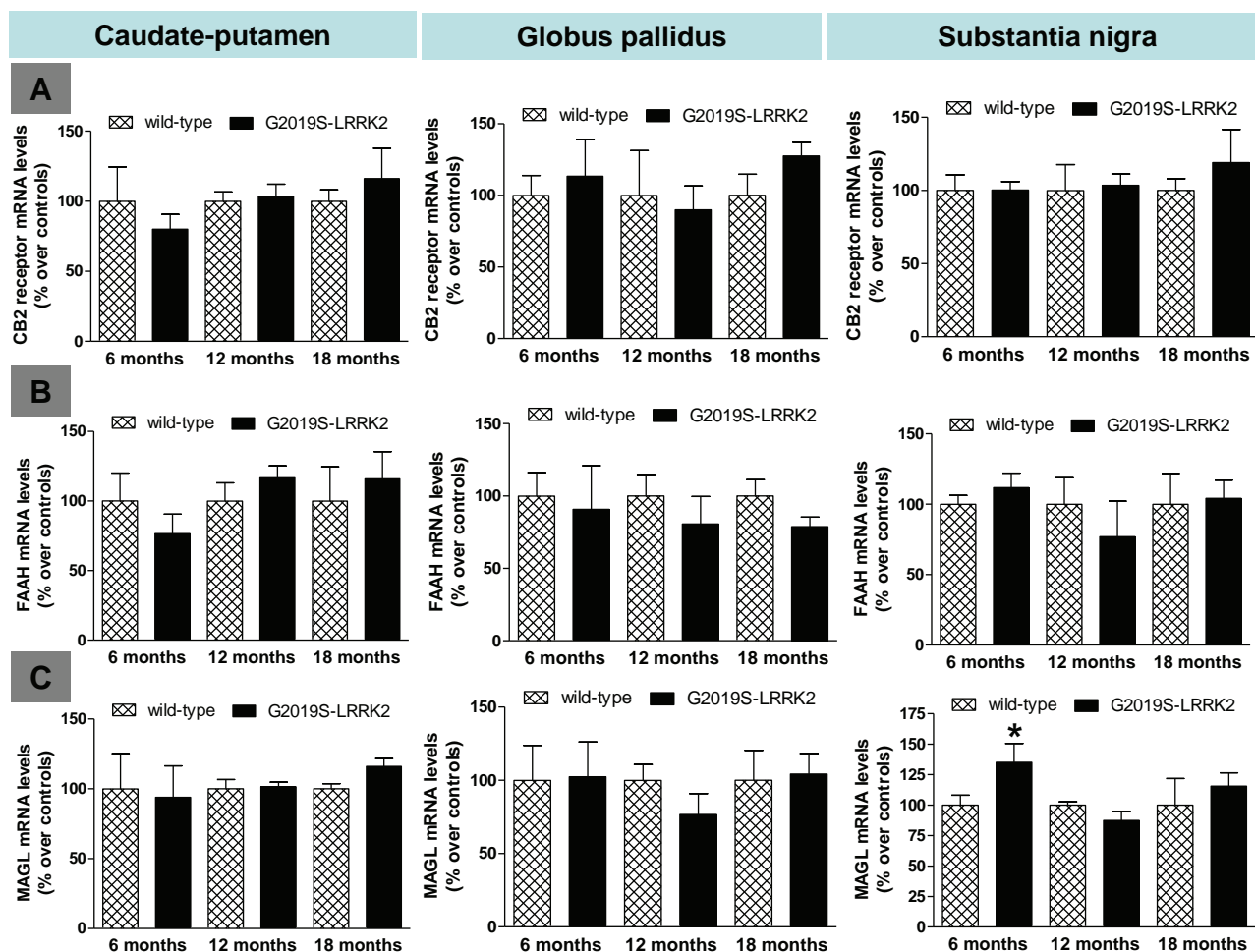


Fig. 4. mRNA levels for some endocannabinoid proteins, including the CB₂ receptor (panels A), and the FAAH (panels B) and MAGL (panels C) enzymes, measured by qRT-PCR in the striatum, globus pallidus and substantia nigra of LRRK2 transgenic and wild-type male mice at 6, 12 and 18 months after birth. Values correspond to % over the wild-type for each age and brain area and are expressed as means \pm SEM ($n=6-8$ subjects per group). Data were assessed by the Student's *t*-test (* $p < 0.05$).

including a group of LRRK2 transgenic mice treated with HU-308 and the selective CB₂ receptor antagonist SR144528. Our data in the hanging-wire test strongly demonstrated that the reduction in the time spent by these animals in the hanging-wire was completely reversed by the treatment with HU-308 and that this benefit disappeared when the agonist was combined with SR144528 (Fig. 5; $F(3,51)=3.728$, $p < 0.05$). The data presented in Fig. 5 corresponded to the last time-point analyzed which resulted to be the age at which the benefits with HU-308 were maximal, but we analyzed the evolution of hanging-wire responses since the age of 12 months at which the treatments were initiated, and we can confirm that the attenuating effect of HU-308 was initiated at ages earliest than 18 months (data not shown). Unhappily, we could not accompany these effects of HU-308 by recoveries in the neuronal injury and glial activation in the basal ganglia, which again we could not demonstrate that they take place in the substantia nigra using TH and Iba-1 immunostaining and Nissl staining (Fig. 5). However, we did find that the elevation of LAMP-1 immunolabelling found in LRRK2 transgenic mice was reduced to the levels of wild-type mice when the transgenic mice were treated with HU-308, and this effect involved the activation of CB₂ receptors because it was notably attenuated by co-treatment of HU-308 with SR144528 (Fig. 5; $F(3,20)=3.608$, $p < 0.05$). This supports the idea that CB₂ receptor activation may correct a potential neuronal malfunctioning reflected in the impairment of autophagy response, which would be beneficial for correcting the hanging-wire deficits found

in LRRK2 transgenic mice, although we do not discard that neuronal substrates located in CNS areas other than the basal ganglia may be also implicated in such corrections.

We also analyzed the LRRK2 transgenic mice treated with HU-308 alone or combined with SR144528 in the other three tests. In this case, LRRK2 transgenic mice did not prove any significant alteration in the rotarod performance (Fig. 6), despite the previous data depicted in Fig. 1, and the same happened in the pole test although a certain trend towards a decrease could be appreciated in this case (Fig. 6). In the case of the computer-aided actimeter, we essentially reproduced the same observations than in the first experiment, with no changes in any of the different parameters analyzed in LRRK2 transgenic mice (Fig. 6), except certain trends towards a decrease in the ambulatory activity, mean and maximal velocity, and fast movements (Fig. 6). In general, these trends were not counteracted by the treatment with HU-308 (Fig. 6), but what we found, that supports a probably involvement of the CB₂ receptor, was a reduction in the group of LRRK2 transgenic mice treated with the combination of HU-308 and SR144528 which resulted to be statistically different compared to wild-type animals in the cases of ambulatory activity (Fig. 6; $F(3,53)=3.99$, $p < 0.05$) and mean velocity (Fig. 6; $F(3,53)=4.003$, $p < 0.05$), and a trend towards a decrease for slow movement (Fig. 6; $F(3,54)=2.754$, $p = 0.052$). The same finding derives from the increase seen in the resting time in the group of LRRK2 transgenic mice treated with HU-308 plus SR144528 (Fig. 6; $F(3,54)=2.762$, $p < 0.05$), in all cases indicating

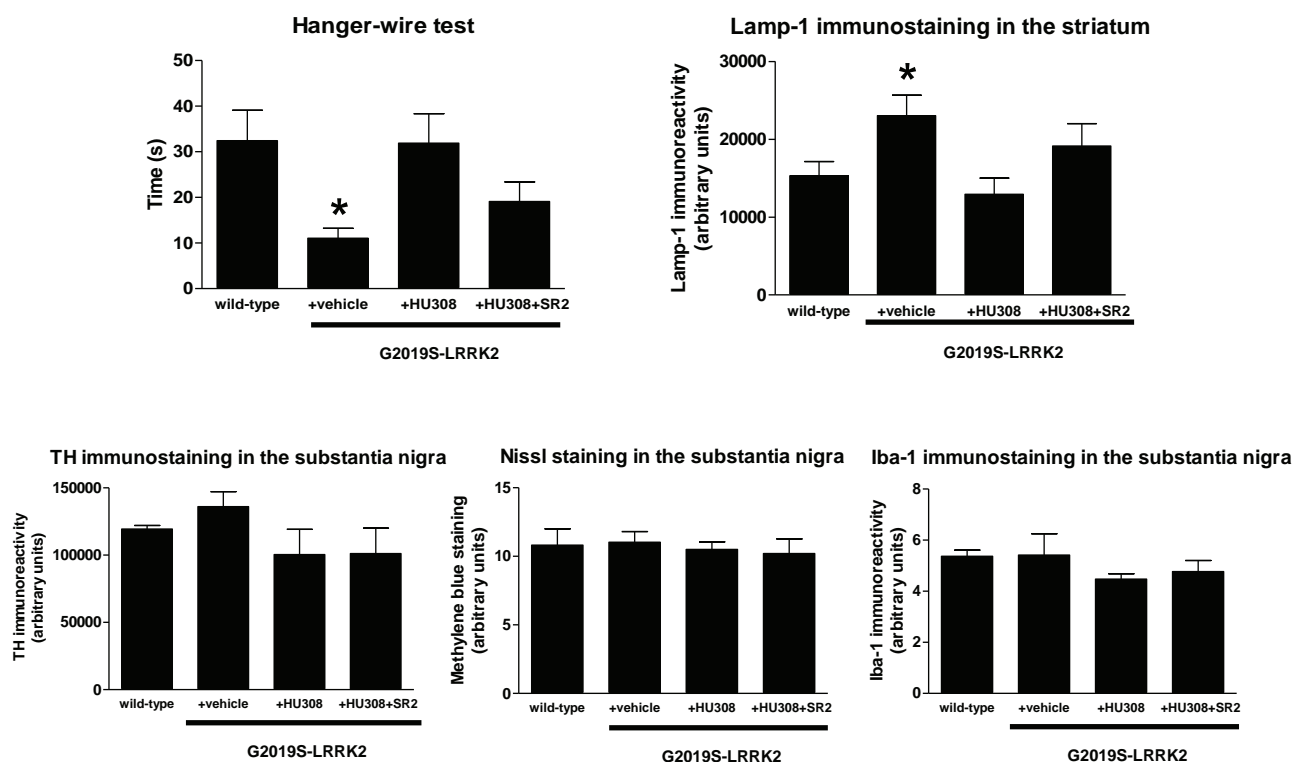


Fig. 5. Time spent in the hanging-wire test and values of LAMP-1, TH and Iba-1 immunostaining and of Nissl-staining in the striatum and/or the substantia nigra of 18 month-old LRRK2 transgenic and wild-type male mice daily treated from the age of 12 months after birth with HU-308 (5 mg/kg), alone or combined with SR144528 (1 mg/kg), and the corresponding vehicle. Values are expressed as means \pm SEM ($n=6-8$ subjects per group). Data were assessed by the one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test (* $p < 0.05$ versus wild-type mice and LRRK2 transgenic mice treated with HU-308).

that the blockade of CB₂ receptors may aggravate the pathological phenotype of LRRK2 transgenic mice with stronger motor deficits in the computer-aided actimeter.

3. Discussion

CB₂ receptors appear to be a promising target in PD to develop novel disease-modifying therapies, in particular to control inflammatory damage of nigrostriatal neurons and the production of cytotoxic factors by activated glial cells, as demonstrated in previous studies [10–13]. That local inflammatory events and glial cytotoxicity are contributing factors to PD pathogenesis have been described in numerous previous studies using a variety of experimental approaches [40–43]. Here, we wanted to further explore the anti-inflammatory/neuroprotective potential of CB₂ receptors in PD using a genetic model of the disease in mice, a fact that has not been investigated to date, perhaps because PD models based on overexpression of mutant proteins (e.g. α -synuclein, PINK-1), or on their genetic ablation (e.g. α -synuclein, parkin), do not appear to reproduce an important level of reactive gliosis leading to inflammatory events. In our case, we wanted to work with a transgenic mouse model expressing the G2019S mutation of LRRK2 gene [27], which represents the most prevalent form of late-onset, autosomal dominant familial PD [16,17]. The reason for this choice was that LRRK2 is highly expressed in microglia [22], and, although its function in these cells remains to be completely determined, it has been proposed, among others, as a player in inflammatory responses [19–21]. Even, given the high expression of LRRK2 not only in microglia but also in macrophages and other immune cells, and its relation with peripheral inflammatory diseases (e.g. Crohn's disease), there is recent proposals in the sense that the parkinsonian effects derived from LRRK2 mutations may initiate in the periphery, but reach the CNS through a permissive blood-brain bar-

rier [44]. Therefore, it appeared *a priori* interesting to investigate the anti-inflammatory/neuroprotective potential of CB₂ receptors in LRRK2 transgenic models, as this receptor is up-regulated in reactive microglia and its activation has been found to be highly effective against neurodegeneration in neurotoxin-based models of this disease [11–13]. Our present data in LRRK2 transgenic mice treated with a selective agonist of the CB₂ receptor confirmed *a priori* this potential, as we obtained strong evidence that the activation of this receptor was associated with a marked attenuation in the progression of behavioral deficits (decreased hanging-wire response) shown by LRRK2 transgenic mice, whereas the blockade of these receptors with a selective antagonist, together with reversing the effects of the agonist, was also associated with an aggravation in some motor abnormalities. However, these data deserve to be tinged in relation with some aspects.

First, despite the undoubtedly benefits reached in the correction of motor deficits with HU-308, it is unlikely to relate these benefits to an improvement in the parkinsonian phenotype of these mice, as this phenotype is really inconspicuous, despite the data published by Ramonet et al. [27] who developed such murine model. In our hands, LRRK2 transgenic mice did not show the expected motor deficits reminiscent of PD (e.g. motor inhibition) in the computer-aided actimeter, as also found in the study by Ramonet et al. [27]. In addition, our neuropathological evaluation at the basal ganglia did not prove any evidence of losses in nigrostriatal dopaminergic neurons, the key neuronal subpopulation affected in PD. This is in contrast with Ramonet et al. [27] who found a loss in nigral neurons of approximately 18% using a better procedure (stereological assessment) to quantify such losses, but it is in concordance with some recent studies conducted in similar models [31,32]. In our study, there was no sign of glial activation, as also found in Ramonet et al. [27]. We then attempted to find any evidence of signs of early parkinsonism, for example, by analyzing ALDH-1 which

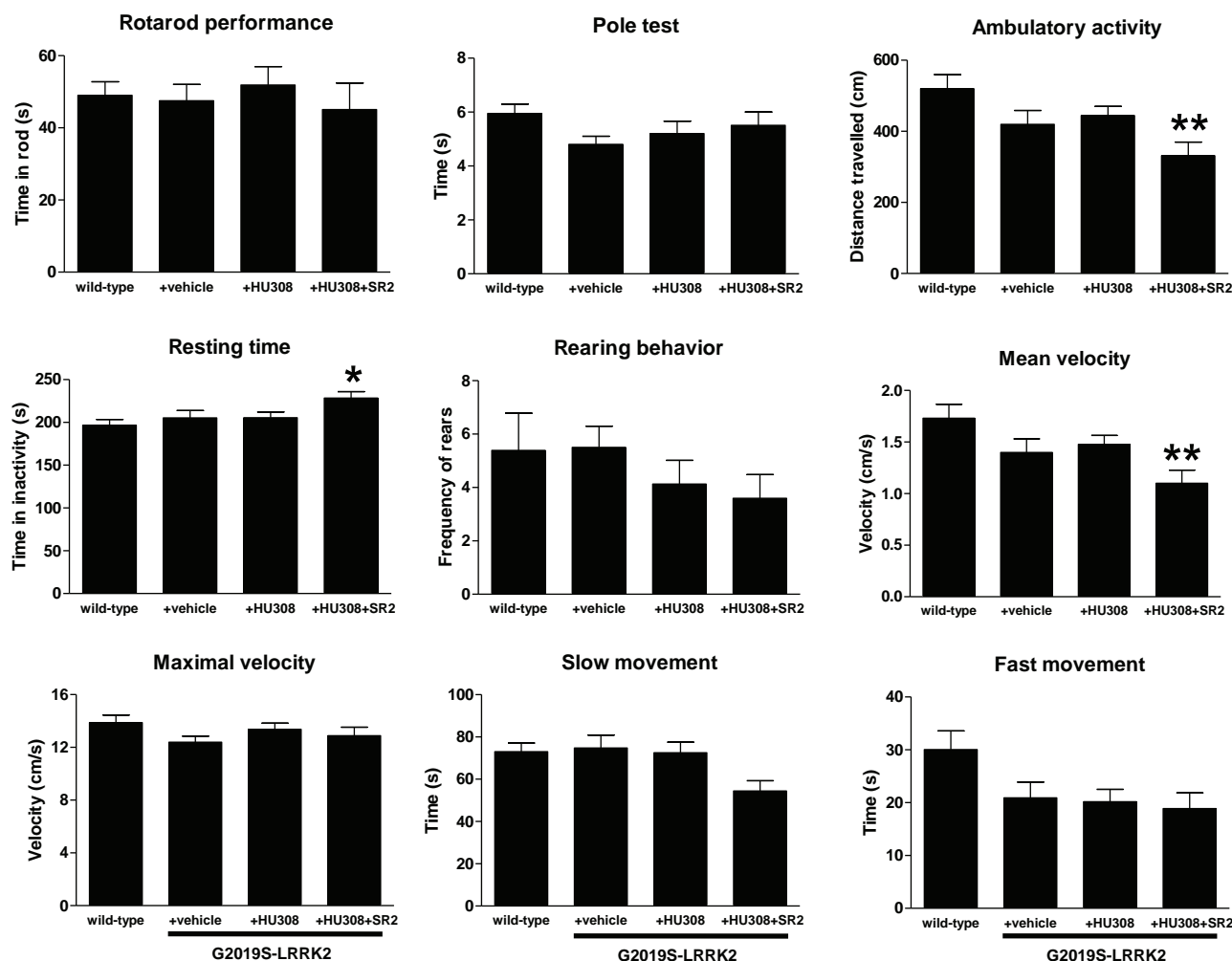


Fig. 6. Analysis of different behavioral responses related to potential motor deficits measured in the pole and rotarod tests, and in a computer-aided actimeter in 18 month-old LRRK2 transgenic and wild-type male mice daily treated from the age of 12 months after birth with HU-308 (5 mg/kg), alone or combined with SR144528 (1 mg/kg), and the corresponding vehicle. Values are expressed as means \pm SEM ($n = 6-8$ subjects per group). Data were assessed by the one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus wild-type mice).

has been associated with the initial phases of the disease [33], but our data did not support such possibility, and the same happened with other markers (e.g. COX-2 and TNF- α) which have an accepted instrumental value in PD [34,35] and, in the case of COX-2, are potentially controlled by LRRK2 [21]. Again, we were unable to find any changes in these markers in the basal ganglia of LRRK2 transgenic mice. The only change we *a priori* found in the basal ganglia of LRRK2 transgenic mice was an elevation in LAMP-1, which is a protein present in the membrane of the lysosome and associated with the formation of autophagosomes, so it can indicate alterations in autophagy that have been also found in this [27] and in other experimental models of PD [36], in particular in protein-related models (e.g. α -synuclein) similar to LRRK2 transgenic mice. Dysregulation in autophagy has been also found in patients having mutations of LRRK2 gene [37], as well as they have been also identified in skeletal muscle in an experimental model of amyotrophic lateral sclerosis characterized by a marked muscle weakness [45] as in our LRRK2 transgenic mice. In our study, the treatment with the selective CB₂ receptor agonist did correct the impairment in autophagy, so it is feasible that this may be the reason for the improvement in hanging-wire responses of LRRK2 transgenic mice. In support of this possibility, previous studies have confirmed a relation between the activation of CB₂ receptors and changes in autophagy in differ-

ent physiopathological conditions (e.g. cancer, multiple sclerosis) [46], with our study being the first one which extends this relation to PD. However, as will be discussed below, the muscle weakness indicated by the deficient hanging-wire responses shown by LRRK2 transgenic mice fits better with alterations in spinal motor neurons rather than with changes at the basal ganglia level, so the issue would require additional investigation.

Second, in line with the modest parkinsonian phenotype seen in these mice and, in particular, with the absence of signs of neurodegeneration and glial activation in the basal ganglia, we were also unable to demonstrate that the endocannabinoid signaling system is altered during the progression of the behavioral anomalies in LRRK2 transgenic mice. At least this can be applied to the basal ganglia, although it would be possible that this signaling system may be altered in other unexplored CNS structures that may be injured in these mice then underlying in the behavioral anomalies found in these animals, but this has not been investigated here. It is particularly relevant that we did not find the expected up-regulation of CB₂ receptors that has been found associated with gliosis in other models of PD [10,12,13] and in postmortem tissues from PD patients [11], as well as in other neurodegenerative disorders [2]. However, this lack of response was expected from the moment that signs of glial activation were not proven in LRRK2 transgenic mice.

Third, despite the lack of up-regulation of CB₂ receptors, the selective activation of these receptors with HU-308 resulted in an improvement in the most intense behavioral anomalies found in LRRK2 transgenic mice, which consisted in the reduction in motor strength found in the hanging-wire test. This improvement was accompanied by a normalization in the impaired autophagy found in these mice, as has been discussed above. However, as also mentioned above, this benefit may be related to anomalies not necessarily linked to the development of parkinsonism and to damage/synaptic malfunctioning at the basal ganglia level, so we assume that the cellular substrates, in which the CB₂ receptors responsible of this improvement are located, should be also investigated outside the basal ganglia. We attempted first to search in the cerebellum, in particular in the Purkinje cells which contain CB₂ receptors [47], assuming that these cells may be altered in LRRK2 transgenic mice, but we did not obtain any experimental evidence in this sense using calbindin immunostaining. Given that the key reason for a reduced performance in the hanging-wire test is muscle weakness, we hypothesize that these cellular substrates may be the neuron-muscle joint and the spinal motor neurons, exactly those that degenerate in neuromuscular disorders including amyotrophic lateral sclerosis. It is important to remark that a deficient performance in the hanging wire test is typical of murine models of these neuromuscular disorders [48]. Unhappily, tissues from LRRK2 transgenic mice to confirm this were not available in our study, as our animals were euthanized before we know the absence of basal ganglia deterioration.

In summary, our data support the interest of the CB₂ receptor as a potential pharmacological target in LRRK2 transgenic mice, as its activation improved behavioral abnormalities in parallel to a normalization of the changes in autophagy found in the basal ganglia of these mice. However, the type of behavioral abnormalities developed by these mice, which include problems in motor coordination and, in particular, in muscle strength, do not completely fit with the presumed parkinsonian features of these mice, thus indicating that CNS areas other than the basal ganglia may be also involved in behavioral benefits derived from the selective CB₂ receptor activation. This supports the interest to furtherly investigate potential alterations in non-basal ganglia structures, in particular, in upper and lower motor neurons and the neuron-muscle synapse.

4. Methods

4.1. Animals, treatments and sampling

All experiments were conducted with male B6;C3-Tg(PDGFβ-LRRK2*G2019S) 340Djmo/J and wild-type littermate sibling mice purchased to Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and received in our animal facilities when animals have 3–4 months of age. For security reasons, they were subjected to genotyping for identifying the presence or absence of the transgene containing the LRRK2 mutation [27]. All animals were housed in a room with controlled photoperiod (08:00–20:00 light) and temperature (22 ± 1 °C) with free access to standard food and water. All experiments were conducted according to local and European rules (directive 2010/63/EU) and approved by the Committee for Animal Experimentation of our university (code 127/2012). In a first experiment, we used non-transgenic (n = 24) and LRRK2 transgenic (n = 24) male mice for a longitudinal study aimed at evaluating the progression of the neurological (weight and motor deficits) phenotype following a monthly pattern from 6 till 18 months of age. Groups of both non-transgenic and transgenic mice (n = 8 per group) were euthanized at three specific ages: 6, 12 and 18 month-old, following the data described by Ramonet et al. [27] who situated the onset of motor deficits in the range 12–18 months

of age, and the neuropathological evidence of neuronal losses in the basal ganglia after 18 months of age [27]. Immediately after being euthanized, their brains were rapidly removed, with the right hemibrain frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice, and stored at –80 °C for subsequent biochemical analyses (qRT-PCR), and the left hemibrain immersed in paraformaldehyde for 24 h and cryoprotected with 30% sucrose for immunostaining procedures. In a second experiment, we conducted pharmacological studies with LRRK2 transgenic male mice and their non-transgenic littermate siblings starting the treatment at 12 months of age. Treatments consisted of a daily i.p. injection of the selective CB₂ receptor agonist HU-308 [49] (purchased to Tocris-Bioscience, Bristol, UK) and used at a dose of 5 mg/kg, alone or combined with the selective CB₂ receptor antagonist SR144528 [50] (purchased to Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) and used at a dose of 1 mg/kg. Wild-type animals and a group of LRRK2 transgenic mice were also treated with the vehicle (Tween 80-saline, 1:16). The doses of HU-308 and SR144528 are within the range of effective doses for both CB₂ receptor ligands when they were administered in experimental models of neurodegenerative disorders including PD [11]. The treatment was repeated every day up to animals reached the age of 18 months after birth, in theory an age at which the neuropathological analysis of LRRK2 transgenic should prove the existence of neuronal losses in the basal ganglia [27]. Every two months, all animals were subjected to neurological examination using different motor tests (always carried out 24 h after the last injection), and they were euthanized at the age of 18 months just immediately after the last behavioral evaluation. In this experiment, 6–8 animals were used per experimental group. As in the first experiment, immediately after animals were euthanized, their brains were rapidly removed, with the right hemibrain frozen in 2-methylbutane cooled in dry ice, and stored at –80 °C for subsequent biochemical analyses (qRT-PCR), and the left hemibrain immersed in paraformaldehyde for 24 h and cryoprotected with 30% sucrose for immunostaining procedures.

4.2. Behavioral recording

LRRK2 transgenic and wild-type male mice were evaluated for possible motor deficits (motor inhibition, incoordination and muscle weakness) in a series of behavioral tests that are frequently used for detecting such motor abnormalities.

4.2.1. Rotarod test

We used a LE8200 device (Panlab, Barcelona, Spain) following a procedure previously described [51]. After a period of acclimation and training (first session: 0 rpm for 10 s; second and third sessions: 4 rpm for 10 s), animals were tested with an acceleration from 4 to 40 rpm over a period of 300 s. Mice were tested for 3 consecutive trials and the mean of the 3 trials was calculated.

4.2.2. Hanging wire test

Following a procedure previously described [52], mice were placed on a wire cage top, which was slowly inverted and suspended at approximately 30 cm to the floor. The latency to fall from the cage top was recorded.

4.2.3. Pole test

Following a procedure previously described [53], mice were placed head-upward on the top of a vertical rough-surfaced pole (diameter 8 mm; height 55 cm) and the time until animals descended to the floor was recorded with a maximum duration of 120 s. When the mouse was not able to turn downward and instead dropped from the pole, the time was taken as 120 s (default value).

4.2.4. Computer-aided actimeter

Motor activity was analyzed in a computer-aided actimeter (Actitrack, Panlab, Barcelona, Spain). This apparatus consisted of a 45 × 45 cm area, with infra-red beams all around, spaced 2.5 cm, coupled to a computerized control unit that analyzes the following parameters: (i) distance run in the actimeter (ambulation); (ii) time spent in inactivity; (iii) frequency of vertical activity (rearing); (iv) mean and maximal velocity developed during the running; and (v) time spent in fast (>5 cm/s) and slow (<5 cm/s) movements. Animals remained for a period of 10 min in the actimeter, but measurements were only recorded during the final 5 min (first 5 min was used only for animal acclimation).

4.3. Real time qRT-PCR analysis

Total RNA was extracted from striatal samples using either SurePrep RNA/Protein Purification Kit (Fisher Bioreagents, Madrid, Spain) or RNeasy Lipid Tissue Minikit (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain). The total amount of RNA extracted was quantitated by spectrometry at 260 nm and its purity was evaluated by the ratio between the absorbance values at 260 and 280 nm. After genomic DNA was removed (to eliminate DNA contamination), single-stranded complementary DNA was synthesized from 0.25 µg (or higher) of total RNA using RNeasy Mini Quantitect Reverse Transcription (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain) and the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The reaction mixture was kept frozen at –20 °C until enzymatic amplification. Quantitative real-time PCR assays were performed using TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to quantify mRNA levels for CB₂ receptor (ref. Mm00438286.m1), FAAH (ref. Mm00515684.m1), MAGL (ref. Mm00449274.m1), tumor necrosis factor-α (TNF-α) (ref. Mm99999068.m1), COX-2 (ref. Mm00478372.m1) and ADHD-1 (ref. Mm00657317.m1) using GAPDH expression (ref. Mm99999915.g1) as an endogenous control gene for normalization. The PCR assay was performed using the 7300 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the threshold cycle (Ct) was calculated by the instrument's software (7300 Fast System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were expressed as percentages over the wild-type group.

4.4. Immunohistochemical procedures

4.4.1. Tissue slicing

Fixed hemibrains were sliced with a cryostat to obtain coronal sections (30 µm thick), including the areas under investigation, that were collected on gelatin-coated slides. Sections were used for Nissl-staining or immunohistochemistry.

4.4.2. Nissl staining

The frozen brain coronal sections were incubated with a solution of methylene blue 0.1% for 5 min and washed with distilled water. The samples were dehydrated, sealed and coverslipped with not aqueous mounting medium. A Leica DMRB microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and a DFC300FX camera (Leica) were used for the observation and photography of the slides, respectively. For counting the number of Nissl-stained cells, high resolution photomicrographs were taken with the 20× objective under the same conditions of light, brightness and contrast. Four images coming from at least 3 sections per animal were analyzed. The final value for each group is the mean for all animals included in the study. Data were expressed as arbitrary units.

4.4.3. Immunostaining

When sections were used for immunostaining with 3,3'-diaminobenzidine (DAB), then endogenous peroxidase was blocked

by 30 min incubation at room temperature in peroxidase blocking solution (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). After several washes with PBS, sections were incubated overnight at room temperature with the following primary antibodies: (i) polyclonal rabbit anti-TH (Chemicon-Millipore, Temecula, CA, USA) used at 1/500; (ii) polyclonal rabbit anti-Iba-1 antibody (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) used at 1/300; (iii) polyclonal rabbit anti-calbindin antibody (Millipore, Billerica, MA, USA) used at 1/250; and (iv) the hibrydoma monoclonal rat antimouse LAMP-1 antibody 1D4B, which was deposited by Dr. J. Thomas in the Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB; Hybridoma Product 1D4B), created by the NICHD (NIH, Bethesda, MD, USA) and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA, USA. Dilutions were carried out in 0.1 M potassium PBS (KPBS), pH 7.4, containing 5% normal horse serum and 0.1% Triton X-100 (Sigma Chem., Madrid, Spain). After incubation, sections were washed in KPBS, followed by incubation with the corresponding biotinylated secondary antibody (1/400) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 1 h at room temperature. Avidin–biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and DAB substrate–chromogen system (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) were used to obtain a visible reaction product. Negative control sections were obtained using the same protocol with omission of the primary antibody. A Leica DMRB microscope and a DFC300FX camera (Leica, Wetzlar, Germany) were used for the observation and photography of the slides, respectively. For quantification, we used the NIH Image Processing and Analysis software (ImageJ; NIH, Bethesda, MD, USA) using 4–5 randomly selected sections, separated approximately by 200 µm, and observed with 5×–20× objectives depending on the method and the brain area under quantification. In all sections, the same area of the striatum or the substantia nigra was analyzed. Analyses were always conducted by experimenters who were blinded to all animal characteristics. Data were expressed as percentage of immunostaining in the LRRK-2 transgenic mice compared to wild-type mice or as arbitrary units, as required.

4.5. Statistics

Data were assessed by unpaired Student's *t*-test, or one-way or two-way ANOVA (genotype × age) followed by the Bonferroni test, as required.

Conflict of interest

The authors declare that they have not any conflict of interest.

Authors' contribution

CPG conducted the experiments with animals including the pharmacological treatments under the supervision of CG. CPG also conducted the qRT-PCR analysis and all immunolabelling procedures with the help of YGG and the supervision of CG. JFR designed and coordinated the whole study, and analysed the data with CG. JFR prepared the manuscript for submission, which was approved by all authors.

Funding

This work has been supported by grants from CIBERNED (CB06/05/0089), MINECO (SAF2009/11847; SAF2012/39173), CAM (S2011/BMD-2308), Michael J. Fox Foundation-USA and GW Pharmaceuticals Ltd (UK).

Acknowledgements

This work has been supported by grants from CIBERNED (CB06/05/0089), MINECO (SAF2009/11847; SAF2012/39173), CAM (S2011/BMD-2308), Michael J. Fox Foundation-USA and GW Pharmaceuticals Ltd. (UK). These agencies had no further role in study design, the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the paper for publication. Authors are indebted to María Mazariegos and Laura Delgado from VISAVET for their technical support in animal care, and to Yolanda García-Movellán for administrative support.

References

- [1] V. Chiurchiù, A. Leuti, M. Maccarrone, Cannabinoid signaling and neuroinflammatory diseases: a melting pot for the regulation of brain immune responses, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 10 (2015) 268–280.
- [2] J. Fernández-Ruiz, M.A. Moro, J. Martínez-Orgado, Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications, *Neurotherapeutics* 12 (2015) 793–806.
- [3] Y.C. Chung, E. Bok, S.H. Huh, J.Y. Park, S.H. Yoon, S.R. Kim, et al., Cannabinoid receptor type 1 protects nigrostriatal dopaminergic neurons against MPTP neurotoxicity by inhibiting microglial activation, *J. Immunol.* 187 (2011) 6508–6517.
- [4] M. Fidaleo, F. Fanelli, M.P. Ceru, S. Moreno, Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) and its lipid ligands, *Curr. Med. Chem.* 21 (2014) 2803–2821.
- [5] J.M. Duarte, S.G. Ferreira, R.A. Carvalho, R.A. Cunha, A. Köfalvi, CB₁ receptor activation inhibits neuronal and astrocytic intermediary metabolism in the rat hippocampus, *Neurochem. Int.* 60 (2012) 1–8.
- [6] S.R. Smith, C. Terminelli, G. Denhardt, Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 136–150.
- [7] F. Molina-Holgado, E. Pinteaux, J.D. Moore, E. Molina-Holgado, C. Guaza, R.M. Gibson, et al., Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia, *J. Neurosci.* 23 (2003) 6470–6474.
- [8] W.S. Sheng, S. Hu, H.T. Ni, R.B. Rock, P.K. Peterson, WIN55,212-2 inhibits production of CX3CL1 by human astrocytes: involvement of p38 MAP kinase, *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4 (2009) 244–248.
- [9] E.J. Carrier, C.S. Kearns, A.J. Barkmeier, N.M. Breese, W. Yang, K. Nithipatikom, et al., Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB₂ receptor-dependent mechanism, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 999–1007.
- [10] D.A. Price, A.A. Martinez, A. Seillier, W. Koek, Y. Acosta, E. Fernández, et al., WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.* 29 (2009) 2177–2186.
- [11] Y. Gómez-Gálvez, C. Palomo-Garo, J. Fernández-Ruiz, C. García, Potential of the cannabinoid CB₂ receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 64 (2016) 200–208.
- [12] C. García, C. Palomo-Garo, M. García-Arencibia, J. Ramos, R. Pertwee, J. Fernández-Ruiz, Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ^9 -THCV in animal models of Parkinson's disease, *Br. J. Pharmacol.* 163 (2011) 1495–1506.
- [13] R.M. Concannon, B.N. Okine, D.P. Finn, E. Dowd, Differential upregulation of the cannabinoid CB₂ receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 269 (2015) 133–141.
- [14] A. Ternianov, J.M. Pérez-Ortiz, M.E. Solesio, M.S. García-Gutiérrez, A. Ortega-Alvaro, F. Navarrete, et al., Overexpression of CB₂ cannabinoid receptors results in neuroprotection against behavioral and neurochemical alterations induced by intracaudate administration of 6-hydroxydopamine, *Neurobiol. Aging* 33 (421) (2012) e1–e16.
- [15] R. Kumaran, M.R. Cookson, Pathways to Parkinsonism Redux: convergent pathobiological mechanisms in genetics of Parkinson's disease, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) R32–R44.
- [16] A. Zimprich, S. Biskup, P. Leitner, P. Lichtner, M. Farrer, S. Lincoln, et al., Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology, *Neuron* 44 (2004) 601–607.
- [17] C. Paisán-Ruiz, S. Jain, E.W. Evans, W.P. Gilks, J. Simón, M. van der Brug, et al., Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease, *Neuron* 44 (2004) 595–600.
- [18] E. Meylan, J. Tschopp, The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress, *Trends Biochem. Sci.* 30 (2005) 151–159.
- [19] F. Gillardon, R. Schmid, H. Draheim, Parkinson's disease-linked leucine-rich repeat kinase 2(R1441G) mutation increases proinflammatory cytokine release from activated primary microglial cells and resultant neurotoxicity, *Neuroscience* 208 (2012) 41–48.
- [20] M.S. Moehle, P.J. Webber, T. Tse, N. Sukar, D.G. Standaert, T.M. DeSilva, et al., LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses, *J. Neurosci.* 32 (2012) 1602–1611.
- [21] R. López de Maturana, J.C. Aguila, A. Sousa, N. Vázquez, P. Del Rio, A. Aiastui, et al., Leucine-rich repeat kinase 2 modulates cyclooxygenase 2 and the inflammatory response in idiopathic and genetic Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging* 35 (2014) 1116–1124.
- [22] B. Kim, M.S. Yang, D. Choi, J.H. Kim, H.S. Kim, W. Seol, et al., Impaired inflammatory responses in murine Lrrk2-knockdown brain microglia, *PLoS One* 7 (2012) e34693.
- [23] F. Gillardon, Leucine-rich repeat kinase 2 phosphorylates brain tubulin- β isoforms and modulates microtubule stability—a point of convergence in parkinsonian neurodegeneration? *J. Neurochem.* 110 (2009) 1514–1522.
- [24] E. Ohta, F. Kawakami, M. Kubo, F. Obata, LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations, *FEBS Lett.* 585 (2011) 2165–2170.
- [25] C.J. Gloeckner, A. Schumacher, K. Boldt, M. Ueffing, The Parkinson disease-associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro, *J. Neurochem.* 109 (2009) 959–968.
- [26] S. Kamikawaji, G. Ito, T. Iwatsubo, Identification of the autophosphorylation sites of LRRK2, *Biochemistry* 48 (2009) 10963–10975.
- [27] D. Ramonet, J.P. Daher, B.M. Lin, K. Stafa, J. Kim, R. Banerjee, et al., Dopaminergic neuronal loss, reduced neurite complexity and autophagic abnormalities in transgenic mice expressing G2019S mutant LRRK2, *PLoS One* 6 (2011) e18568.
- [28] C.Y. Chen, Y.H. Weng, K.Y. Chien, K.J. Lin, T.H. Yeh, Y.P. Cheng, et al., (G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1623–1633.
- [29] J.S. Chou, C.Y. Chen, Y.L. Chen, Y.H. Weng, T.H. Yeh, C.S. Lu, et al., (G2019S) LRRK2 causes early-phase dysfunction of SNpc dopaminergic neurons and impairment of corticostriatal long-term depression in the PD transgenic mouse, *Neurobiol. Dis.* 68 (2014) 190–199.
- [30] M. García-Miralles, J. Coomaraswamy, K. Häbig, M.C. Herzig, N. Funk, F. Gillardon, et al., No dopamine cell loss or changes in cytoskeleton function in transgenic mice expressing physiological levels of wild type or G2019 mutant LRRK2 and in human fibroblasts, *PLoS One* 10 (2015) e0118947.
- [31] M. Yue, K.M. Hinkle, P. Davies, E. Trushina, F.C. Fiesel, T.A. Christenson, et al., Progressive dopaminergic alterations and mitochondrial abnormalities in LRRK2 G2019S knock-in mice, *Neurobiol. Dis.* 78 (2015) 172–195.
- [32] G. Liu, C. Sgobio, X. Gu, L. Sun, X. Lin, J. Yu, et al., Selective expression of Parkinson's disease-related Leucine-rich repeat kinase 2 G2019S missense mutation in midbrain dopaminergic neurons impairs dopamine release and dopaminergic gene expression, *Hum. Mol. Genet.* 24 (2015) 5299–52312.
- [33] E. Grünblatt, S. Zehetmayer, C.P. Jacob, T. Müller, W.H. Jost, P. Riederer, Pilot study: peripheral biomarkers for diagnosing sporadic Parkinson's disease, *J. Neural. Transm.* 117 (2010) 1387–1393.
- [34] P. Teismann, K. Tieu, D.K. Choi, D.C. Wu, A. Naini, S. Hunot, et al., Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5473–5478.
- [35] A.L. De Lella Ezcurra, M. Chertoff, C. Ferrari, M. Graciarena, F. Pitossi, Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor- α in the substantia nigra elicits progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation, *Neurobiol. Dis.* 37 (2010) 630–640.
- [36] E.D. Plowey, C.T. Chu, Synaptic dysfunction in genetic models of Parkinson's disease: a role for autophagy? *Neurobiol. Dis.* 43 (2011) 60–67.
- [37] L.N. Hockey, B.S. Kilpatrick, E.R. Eden, Y. Lin-Moshier, G.C. Brailoiu, E. Brailoiu, et al., Dysregulation of lysosomal morphology by pathogenic LRRK2 is corrected by TPC2 inhibition, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 232–238.
- [38] A. Silva-Fernandes, S. Duarte-Silva, A. Neves-Carvalho, M. Amorim, C. Soares-Cunha, P. Oliveira, et al., Chronic treatment with 17-DMAG improves balance and coordination in a new mouse model of Machado-joseph disease, *Neurotherapeutics* 11 (2014) 433–449.
- [39] S. Yang, C. Xia, S. Li, L. Du, L. Zhang, Y. Hu, Mitochondrial dysfunction driven by the LRRK2-mediated pathway is associated with loss of Purkinje cells and motor coordination deficits in diabetic rat model, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1217.
- [40] H. Chen, E. Jacobs, M.A. Schwarzschild, M.L. McCullough, E.E. Calle, M.J. Thun, et al., Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 58 (2005) 963–967.
- [41] Y. Ouchi, E. Yoshikawa, Y. Sekine, M. Futatsubashi, T. Kanno, T. Ogasu, et al., Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 57 (2005) 168–175.
- [42] D.Y. Choi, M. Liu, R.L. Hunter, W.A. Cass, J.D. Pandya, P.G. Sullivan, et al., Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats, *PLoS One* 4 (2009) e5482.
- [43] R.L. Hunter, B. Cheng, D.Y. Choi, M. Liu, S. Liu, W.A. Cass, et al., Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces parkinsonism in C57/B6 mice, *J. Neurosci. Res.* 87 (2009) 1913–1921.
- [44] E. Greggio, L. Civiero, M. Bisaglia, L. Bubacco, Parkinson's disease and immune system: is the culprit LRRK2 in the periphery? *J. Neuroinflammation* 9 (94) (2012).
- [45] S. Oliván, A.C. Calvo, S. Gasco, M.J. Muñoz, P. Zaragoza, R. Osta, Time-point dependent activation of autophagy and the UPS in SOD1G93A mice skeletal muscle, *PLoS One* 10 (2015) e0134830.

- [46] C. Hiebel, C. Behl, The complex modulation of lysosomal degradation pathways by cannabinoid receptors 1 and 2, *Life Sci.* 138 (2015) 3–7.
- [47] C. Rodríguez-Cueto, C. Benito, J. Fernández-Ruiz, J. Romero, M.L. Hernández-Gálvez, M. Gómez-Ruiz, Changes in CB1 and CB2 receptors in the post-mortem cerebellum of humans affected by spinocerebellar ataxias, *Br. J. Pharmacol.* 171 (2014) 1472–1489.
- [48] A. Ferry, P. Joanne, W. Hadj-Said, A. Vignaud, A. Lilienbaum, C. Hourdé, et al., Advances in the understanding of skeletal muscle weakness in murine models of diseases affecting nerve-evoked muscle activity, motor neurons, synapses and myofibers, *Neuromuscul. Disord.* 24 (2014) 960–972.
- [49] L. Hanus, A. Breuer, S. Tchilibon, S. Shiloah, D. Goldenberg, M. Horowitz, et al., HU-308: a specific agonist for CB2, a peripheral cannabinoid receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 14228–14233.
- [50] M. Rinaldi-Carmona, F. Barth, J. Millan, J.M. Derocq, P. Casellas, C. Congy, et al., SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 284 (1998) 644–650.
- [51] C. Monville, E.M. Torres, S.B. Dunnett, Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model, *J. Neurosci. Methods* 158 (2006) 219–223.
- [52] E.A. Del Bel, A.S. Souza, F.S. Guimarães, C.A. da-Silva, L.P. Nucci-da-Silva, Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice, *Psychopharmacology (Berl.)* 161 (2002) 32–37.
- [53] K. Matsuura, H. Kabuto, H. Makino, N. Ogawa, Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion, *J. Neurosci. Methods* 73 (1997) 45–48.

